

ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია

ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები



ნიკოლოზ ჟღენტი
ოთარ ბიბილაშვილი

ნიკოლოზ ჟღენტაძე | ოთარ ბიბილაშვილი

ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია

ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები

თბილისი | 2025

რედაქტორი: ნანა კოშტორიძე

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი. ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოქიმიის კათედრის გამგე, სრული პროფესორი

რეცენზენტები: ნინო ოკრიპელაშვილი

მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი. ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ფსიქიატრიისა და სამედიცინო ფსიქოლოგიის კათედრის გამგე, სრული პროფესორი

დავით გიგინეიშვილი

მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი. ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ნევროლოგიისა და ნეიროქირურგიის კათედრის ასოცირებული პროფესორი

თაშილა ბაგაშვილი

ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი. ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის პათოლოგიისა და სასამართლო მედიცინის კათედრის ასოცირებული პროფესორი. ივ. ბერიტაშვილის სახელობის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის უფროსი მეცნიერ-თანამშრომელი (ექსპერიმენტული ნევროლოგიის ლაბორატორია)

ელენე დავითაშვილი

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი. ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოქიმიის კათედრის ასოცირებული პროფესორი

ავტორთა სტილი დაცულია

© ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის გამომცემლობა, 2025
ISBN 978-9941-36-446-4 (pdf)

[illegible]

Տախտակագրություն,
 Երկրագործական լուս. տնտ. Ժողովրդագրություն

ნიგზში გამოყენებული აბრევიატურები და შემოკლებები

ATP - ადენოზინ ტრიფოსფატი

BSA - ხარის პლაზმის ალბუმინი

DMSO - დიმეთილსულფოქსიდი

DTT - დითიოტრეიტოლი

EDTA - ეთილენდიამინტეტრამარმჟავა

EGTA - ეთილენგლიკოლ-ბის (2-ამინოეთილის ეთერი) - N,N,N',N'-ტეტრამარმჟავა

Hb (ან HGB) - ჰემოგლობინი

HEPES - 4- (2-ჰიდროქსიეთილ)-1-პიპერიზინ ეთანსულფატი

I.C - ინტრაკრანიალური ინექცია (Intracranial Injection)

I.C.V - ინტრაკრანოვენტრიკულური ინექცია (Intracranioventricular Injection)

I.M - ინტრამუსკულარული ინექცია (Intramuscular Injection)

I.P - ინტრაპერიტონეული ინექცია (Intraperitoneal Injection)

I.V - ინტრავენური ინექცია (Intavenous Injection)

MCH - ჰემოგლობინის საშუალო შემცველობა ერითროციტებში

MCHC - ჰემოგლობინის საშუალო კონცენტრაცია ერითროციტებში

MCV - ერითროციტების საშუალო მოცულობა

MES - 2-(N-მორფოლინო) ეთანსულფატი

MTT - 3-(4,5-დიმეთილთიაზოლ-2-ილ)-2,5-დიფენილ ტეტრაზოლიუმბრომიდი

NAD - ნიკოტინამიდ მონონუკლეოტიდი

NADP - ფოსფორილირებული ნიკოტინამიდ მონონუკლეოტიდი

OD - ოპტიკური შექმთანოქმა (Optical Density)

PB - ფოსფატის ბუფერი, რომელიც არ შეიცავს NaCl-ს (იხ. დანართი 2)

PBS - ფოსფატის ბუფერი, რომელიც შეიცავს NaCl-ს (იხ. დანართი 2)

PCV - ჰემატოკრიტი

Per Os (P.S) - პერ ორალური მიღება

RBC - ერითროციტების რაოდენობა

RT°C - ოთახის ტემპერატურა

S.C - კანქვეშა ინექცია (Subcutaneous Injection)

SDS - ნატრიუმის დოდეცილსულფატი (იგივე ნატრიუმის ლაურილსულფატი)

TAE - ტრის-აცეტატის ბუფერი

TCA - ტრიქლორმარმჟავა

Tris - ტრისჰიდროქსიმეთილ ამინომეთანი

WBC - ლეიკოციტების რაოდენობა

“X” - X -ჯერ კონცენტრირებული (მაგ. x10 - 10 -ჯერ კონცენტრირებული)

ვ - ვოლტი

კგ - კილოგრამი

მ - მეტრი

წთ - წუთი

წმ - წამი

მოლ. - მოლი

წარმოებული ერთეულების ათის წილადი წინსართები			
წინსართი	ქართული აღნიშვნა	საერთაშ. აღნიშვნა	ეკვივალენტი
მეგა	მგ	M	10 ⁶
კილო	კ	k	10 ³
დეკა	დკ	dc	10 ¹
დეცი	დ	d	10 ⁻¹
სანტი	ს	c	10 ⁻²
მილი	მ	m	10 ⁻³
მიკრო	მკ	μ	10 ⁻⁶
ნანო	ნ	n	10 ⁻⁹
პიკო	პ	p	10 ⁻¹²
ფემტო	ფ	f	10 ⁻¹⁵
ატო	ა	a	10 ⁻¹⁸

ს ა რ ჩ ე ვ ი

ნაწილი I მოლექულორი ფსიქიატრიის ზოგადი საკითხები

თავი I შესავალი მოლექულორი ფსიქიატრიაში.....	10
§1.1 მოკლედ მოლექულორი ფსიქიატრიის რაობაზე	10
§1.2 კვლევის ობიექტები მოლექულორი ფსიქიატრიაში	10
§1.3 მოდელის ვალიდურობის შეფასება	11
თავი II ლაბორატორიული ცხოველების მოვლისა და მათზე ცდების ჩატარების შესახებ	12
§2.1 ლაბორატორიულ ცხოველთა ფიზიოლოგიური ნორმები	12
§2.1.1 ლაბორატორიული თავგები	12
§2.1.2 ლაბორატორიული ვირთავები	16
§2.1.3 ლაბორატორიული ზებრათეგები (Danio rerio)	18
§2.2 ანესთეზიის მეთოდები და დოზები	20
§2.2.1 ანესთეზიის მეთოდები და დოზები თავებისა და ვირთავებისათვის	20
§2.2.2 ანესთეზიის მეთოდები და დოზები ზებრათეგებისათვის	22
§2.3 ევთანაზიის მეთოდები ლაბორატორიული ცხოველებისთვის	23
§2.3.1 ევთანაზია ლაბორატორიულ მღრღნელებში	23
§2.3.2 ევთანაზია ლაბორატორიულ ზებრათეგებში	23
§2.4 ინექციების მეთოდოლოგია ლაბორატორიულ ცხოველებში	24
§2.4.1 ფარმაცევტული კალკულაციის ზოგიერთი საკითხი	24
§2.4.2 ინექციების ტექნიკური დეტალები	24
თავი III ნევროლოგიურ და ფსიქიკურ აშლილობათა მოდელირების მეთოდები.....	28
§3.1 ნეიროდეგენერაციული დაავადებები	28
§3.1.1 ალცჰაიმერის დაავადება.....	28
§3.1.2 პარკინსონის დაავადება.....	31
§3.2 შიზოფრენია	35
§3.3 ბიპოლარული აშლილობა	37
§3.4 დეპრესია	38
§3.5 ანორექსია.....	40
§3.6 ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობა (OCD).....	42
§3.7 ყურადღების დეფიციტისა და ჰიპერაქტიურობის აშლილობა (ADHD)	43
§3.8 აუტისტური სპექტრის აშლილობა	44
§3.9 ალკოჰოლდამოკიდებულება და აბსტინენციური სინდრომი	45
თავი IV ქცევითი კვლევის მეთოდები.....	49
§4.1 ღია ველის ტესტი (Open Field Test)	49
§4.2 შევიწროვებადი ბილიკის ტესტი (The Beam Walking Test)	50
§4.3 აჩქარებადი როტაროდის ტესტი (Accelerating Rotarod Test).....	50
§4.4 ჯვარედინი ლაბირინთის ტესტი (Plus Maze Test).....	51
§4.5 ვერტიკალური საცერის ტესტი (Vertical Screen Test)	52
§4.6 ამოტრიალებული საცერის ტესტი (Inverted Screen Test)	52
§4.7 წონის ტესტი (Weights Test)	53
§4.8 იძულებითი ცურვის ტესტი (Forced Swim Test)	54

§4.9 მორისის წყლის ლაბირინთის ტესტი (Morris Water Maze Test).....	55
§4.10 პასიური განრიდების ტესტი (Passive Avoidance Test).....	55
§4.11 კუდით დაკიდების ტესტი (Tail Suspension Test).....	56

ნაწილი II ბიოქიმიური კვლევის მეთოდები

თავი V სუბუჯრედული ფრაქციონირების მეთოდები	61
§5.1 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღების სქემა დე-რობერტისის მეთოდით	61
§5.2 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღების სქემა შნაიდერის მეთოდით.....	63
§5.3 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღების სქემა მენდელზ-სტილმანის მეთოდით	64
§5.4 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღების სქემა სონგის მიხედვით	65
§5.5 ფრაქციონირება გრადიენტული ცენტრიფუგირების მეთოდით	66
§5.6 გოლჯის კომპლექსის გამოყოფის მეთოდი ჩენის მიხედვით.....	66
§5.7 გლიური უჯრედების გამოყოფა კუთხური როტორით	66
§5.8 პრე- და პოსტ-სინაფსური ფრაქციების გამოყოფის მეთოდი	68
თავი VI ცილების შესწავლის მეთოდები	69
§6.1 ცილების გამოლექვის მეთოდები	69
§6.2 ცილების რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები	70
§6.2.1 ცილების რაოდენობრივი განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდით	70
§6.2.2 ცილების რაოდენობრივი განსაზღვრა ლოურის მეთოდით	70
§6.2.3 ცილების რაოდენობრივი განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით	73
§6.3 ცილების ფრაქციონირებისა და დეტექციის მეთოდები	73
§6.3.1 ცილების ფრაქციონირება გამომარილების მეთოდით	73
§6.3.2 ცილების ფრაქციონირება SDS-PAGE მეთოდით	74
§6.3.3 ცილების ფრაქციონირება ნატიური ელექტროფორეზის მეთოდით	75
§6.3.4 ცილების სპეციფიკური დეტექცია Western-Blotting მეთოდით	75
§6.3.5 ცილების ფრაქციონირება გელ-ფილტრაციული ქრომატოგრაფიის მეთოდით.....	76
§6.3.6 ცილების სპეციფიკური დეტექცია აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდით	77
§6.3.7 ცილების ფრაქციონირება მაღალ-ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით.....	78
§6.4 ფუნქციური ჯგუფების შესწავლის მეთოდები	79
§6.4.1 სულფჰიდრილური (SH) ჯგუფების რაოდენობრივი განსაზღვრა	79
თავი VII ლიპიდების შესწავლის მეთოდები.....	81
§7.1 ლიპიდების გამოყოფა ფოლხის მეთოდით	81
§7.2 ლიპიდების რაოდენობრივი განსაზღვრა	82
თავი VIII ნახშირწყლების შესწავლის მეთოდები.....	83
§8.1 ნახშირწყლების რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები	83
§8.1.1 გლუკოზის რაოდენობრივი განსაზღვრა	83
§8.1.2 გლუკოზისა და გლიკოგენის რაოდენობრივი განსაზღვრა	84
§8.1.3 ლაქტატის რაოდენობრივი განსაზღვრა	85
§8.2 გლიკოლიზის შესწავლა	85
§8.2.1 ჰექსოკინაზას აქტივობის განსაზღვრა	85
§8.2.2 ფოსფოფრუქტოკინაზას აქტივობის განსაზღვრა	86
§8.2.3 ალდოლაზას აქტივობის განსაზღვრა	87
§8.2.4 პირუვატ დეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა	90

თავი IX ნუკლეინის მჟავების შესწავლის მეთოდები.....	93
§9.1 ნუკლეინის მჟავების გამოყოფის მეთოდები	93
§9.2 ნუკლეინის მჟავების რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები	94
§9.2.1 დნმ-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა	94
§9.2.2 დნმ-ისა და რნმ-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა	95
§9.3 ნუკლეინის მჟავების ფრაქციონირების მეთოდები	96
თავი X ფერმენტოლოგიური კვლევის საფუძვლები.....	99
§10.1 ფერმენტის კინეტიკური პარამეტრების შესწავლა	99
§10.2 რეაქციის სიჩქარისა და სუბსტრატის კონცენტრაციის დამოკიდებულების შესწავლა	101
§10.3 რეაქციის სიჩქარის pH-ზე დამოკიდებულების შესწავლა	101
§10.4 რეაქციის სიჩქარის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების შესწავლა	102
§10.5 ინჰიბიტორების გავლენის შესწავლა	102
თავი XI უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის კვლევის მეთოდები.....	105
§11.1 მიტოქონდრიის ფუნქციური მდგომარეობის შეფასება	105
§11.1.1 მიტოქონდრიის მემბრანის განვლადობის შეფასება.....	105
§11.1.2 მიტოქონდრიის გარდამავალი ფორის (mPTP) აქტივობის განსაზღვრა	108
§11.1.3 მიტოქონდრიის გაჯირჯვების შეფასება	108
§11.1.4 სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა	109
§11.1.5 კრეატინკინაზას აქტივობის შეფასება	109
§11.2 კრებლის ციკლი	110
§11.2.1 იზოციტრატ დეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა.....	110
§11.2.2 α -კეტოგლუტარატ დეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა	110
§11.2.3 სუქცინატ დეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა.....	111
§11.2.4 ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა	112
§11.2.5 მალატ დეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა	112
§11.2.6 აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა.....	113
§11.3 ნიკოტინამიდური კოფერმენტების რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები	113
§11.4 კრეატინისა და ფოსფოკრეატინის რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები	114
§11.4.1 კრეატინის რაოდენობრივი განსაზღვრა.....	114
§11.4.2 ფოსფოკრეატინის რაოდენობრივი განსაზღვრა.....	115
თავი XII ოქსიდაციური სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა.....	117
§12.1 სუპეროქსიდისმუტაზას (SOD) აქტივობის განსაზღვრა	117
§12.2 კატალაზას (CAT) აქტივობის განსაზღვრა	120
§12.3 გლუტათიონ პეროქსიდაზას (GSH-Px) აქტივობის განსაზღვრა	123
§12.4 გლუტათიონ რედუქტაზას (GR) აქტივობის განსაზღვრა	125
§12.5 აზოტის ჟანგის (NO) რაოდენობრივი განსაზღვრა გრისის მეთოდით	127
§12.6 მალონის დიჰიდროგენის (MDA) რაოდენობრივი განსაზღვრა	128
§12.7 უჯერი ცხიმოვანი მჟავების დიენური კონუგატების რაოდენობრივი განსაზღვრა	129
§12.8 ქსანტინ-ოქსიდაზას აქტივობის განსაზღვრა	129
თავი XIII სატრანსპორტო ატფ-აზების შესწავლის მეთოდები.....	131
§13.1 Ca^{2+} ATP -აზას აქტივობის განსაზღვრა	131
§13.2 Na/K ATP -აზას აქტივობის განსაზღვრა	131

ნაწილი III კვლევის მეთოდები მოლეკულურ ბიოლოგიაში

თავი XIV პოლიმერაზულ-ჭაჭვური რეაქცია (PCR).....	135
§14.1 დნმ -ის PCR	135
§14.2 რნმ -ის PCR	135
თავი XV ნუკლეინის მჟავების კონკრეტული თანამიმდევრობების გამოვლენის მეთოდები.....	137
§15.1 Southern Blotting	137
§15.2 Northern Blotting	139
§15.3 ქრომატინის იმუნოპრეციპიტაცია (CHIP)	139

ნაწილი IV ჰისტოქიმიური კვლევის მეთოდები

თავი XVI ცილების შეღებვის მეთოდები	143
§16.1 ცილების სულემ-ბრომფენოლ ლურჯით გამოვლენის მეთოდი	143
§16.2 ცილებთან დაკავშირებული NH ₂ - ჯგუფების გამოვლენა ოქსინ-ნაფტალდეჰიდის მეთოდით.....	144
§16.3 მილონის რეაქცია - ბეკერის მოდიფიკაციით	144
§16.4 ამილოიდის გამოვლენის მეთოდური მეთოდები	145
თავი XVII ნახშირწყლების შეღებვის მეთოდები.....	147
§17.1 ოკამოტოს მეთოდი გლუკოზის გამოსავლენად	147
§17.2 ნახშირწყალშემცველი ლიპიდების გამოვლენის მეთოდები.....	147
§17.3 გალეს მეთოდის მოდიფიკაცია ნერვული ქსოვილისათვის	148
თავი XVIII ლიპიდების შეღებვის მეთოდები.....	151
§18.1 ოკამოტოს მეთოდი ქოლესტერინისა და მისი ეთერების გამოსავლენად	151
§18.2 ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგის პროდუქტების გამოვლენის მეთოდი.....	151
§18.3 ოკამოტოს მეთოდი სფინგომიელინის გამოსავლენად	152
§18.4 შპილმეიერის მოდიფიცირებული მეთოდი მიელინის გამოსავლენად.....	152
§18.5 დეგენიერირებადი მიელინის გამოვლენის მეთოდი	153
§18.6 ფოსფოლიპიდების გამოვლენის მეთოდი	154
თავი XIX ფერმენტების შეღებვის მეთოდები	155
§19.1 მონოამინოქსიდაზას გამოვლენის მეთოდი.....	155
§19.2 სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის გამოვლენის მეთოდი	155
§19.3 გლუტამატდეჰიდროგენაზას აქტივობის გამოვლენის მეთოდი.....	156
§19.4 ციტოქრომ c ოქსიდაზას აქტივობის გამოვლენის მეთოდი	156
თავი XX თავის ტვინის უჯრედების შეღებვის მეთოდები	159
§20.1 ფონტანა-მასონის მეთოდი მელანინის გამოსავლენად.....	159
§20.2 გალმის მეთოდი ვირთაგვას ჰიპოფიზის ბაზოფილების გამოსავლენად	160
§20.3 კრეზილ-იისფრით შეღებვის მეთოდი ნისლის სუბსტანციის გამოსავლენად	161
§20.4 გოლჯის ორიგინალური მეთოდი	162
§20.5 გოლჯი-კოკსის მეთოდი	162
§20.6 გლისის მეთოდი ვლადიმეროვას მოდიფიკაციით	163
§20.7 რამონ-ი-კახალის მეთოდი ფიბროზული ასტროციტების გამოსავლენად	164

დანართი №1 წიგნში გამოყენებულ ნივთიერებათა მოლეკულური მასების ცნობარი
დანართი №2 ბუფერული ხსნარები
დანართი №3 ზოგიერთი ფიქსატორი
დანართი №4 ამონიუმის სულფატით გაჯერების ცხრილი
შეფასებები და რეცენზიები

ნაწილი I

მოლეკულური ფსიქიატრიის
ზოგადი საკითხები

თავი I

შესავალი მოლეკულურ ფსიქიატრიაში

§1.1 მოკლედ მოლეკულური ფსიქიატრიის რაობაზე

ფსიქიატრია, რაც ბერძნულიდან თარგმანში „სულის მკურნალობას“ ნიშნავს, მედიცინის დარგია, რომელიც სწავლობს ფსიქიკურ დაავადებათა წარმოშობას, მათ მიმდინარეობას, კლინიკას, მკურნალობასა და პროფილაქტიკას. იგი მრავალ ქვემომართულებებად იყოფა, როგორებიცაა მაგ. გერონტო-ფსიქიატრია, ნეიროფსიქიატრია, სასამართლო ფსიქიატრია და სხვა. მათ რიგშია ე.წ. მოლეკულური ფსიქიატრია, ანუ მეცნიერება, რომელიც შეისწავლის ფსიქიკის ნორმალური და პათოლოგიური ფუნქციონირების მოლეკულურ მექანიზმებს. აღნიშნული დარგი ტრანსლაციურ მედიცინას მიეკუთვნება და უმნიშვნელოვანეს როლს ასრულებს ფსიქიატრიის, არამხოლოდ როგორც მეცნიერების, არამედ, როგორც მედიცინის დარგის განვითარებაში, ვინაიდან სწორედ მოლეკულური ფსიქიატრიის მიმართულებით მიმდინარე კვლევების წყალობით გვექმნება წარმოდგენა იმ მოლეკულურ პროცესებზე, რომლებიც ყოველი ფსიქიკური აქტის უკან დგას.

საზოგადოდ, ნებისმიერი პათოლოგიის მოდელირება საკმაო სირთულეებთანაა დაკავშირებული, თუმცა მოლეკულურ ფსიქიატრიაში ეს პრობლემა განსაკუთრებულად მწვავეა. ცნობილია ტრანსლაციური კვლევების ორი ძირითადი მიდგომა: *From bedside to bench* (ავადმყოფის საწოლიდან - ლაბორატორიულ მაგიდამდე) და *From bench to bedside* (ლაბორატორიიდან - ავადმყოფის საწოლამდე). პირველი მათგანი გულისხმობს სამეცნიერო კვლევის ჩატარებას კლინიკური კვლევების საფუძველზე. სხვაგვარად რომ ვთქვათ, აღნიშნული კვლევები ეფუძნება დაავადების იმ მახასიათებლებს, რომლებიც აღწერილია კლინიკისტი ექიმების მიერ. ამდენად ტრანსლაციის პირველ ეტაპს წარმოადგენს კლინიკური კვლევა. როდესაც ესა თუ ის დაავადება მეტ-ნაკლებად საკმარისადაა აღწერილი, იწყება *From bedside to bench* ტრანსლაციის მეორე ეტაპი - კვლევა ცხოველურ მოდელზე ანუ *In Vivo* მოდელირება. ამ ეტაპზე მეცნიერები ცდილობენ ამა თუ იმ მანიპულაციის საშუალებით მაქსიმალურად მიაახლოვონ ცხოველის მდგომარეობა დაავადებისათვის სახასიათო მდგომარეობას. თუ კი მოდელი ჩაითვლება ვალიდურად, იწყება ტრანსლაციის მესამე ეტაპი - სპეციფიკური კვლევა, მაგ. აღნიშნული მდგომარეობის გამომწვევი მოლეკულური მექანიზმების, თანმდევი მორფო-ფუნქციური ანდა ქცევითი ცვლილებების შესწავლა.

რაც შეეხება *From bench to bedside* ტრანსლაციას, იგი იწყება მას შემდეგ, რაც მეცნიერებმა საკმაო ინფორმაცია მიიღეს *From bedside to bench* კვლევებით. ახლა მიზანს წარმოადგენს იმ ნივთიერებათა აღმოჩენა და შესწავლა, რომლებიც პოტენციურად გარკვეულ თერაპიულ ან პრევენციულ სარგებელს მოუტანენ ბენეფიციარებს, აღნიშნული ხორციელდება ე.წ. *In Silico* მეთოდით, რაც გულისხმობს სპეციალური პროგრამის საშუალებით ქიმიურ ნაერთთა მოთხოვნისამებრ გადახარისება-შერჩევას. ტრანსლაციის მეორე ეტაპი *In Vitro* კვლევებია, ანუ კვლევები უჯრედულ / ქსოვილოვან კულტურებზე ანდა ქსოვილოვან ანათლებზე. *From bench to bedside* კვლევების მესამე ეტაპი *In Vivo* კვლევაა, რომლის შედეგთა საფუძველზე უკვე შესაძლებელი გახდება პრეკლინიკური კვლევების დაწყება.

§1.2 კვლევის ობიექტები მოლეკულურ ფსიქიატრიაში

ცხადია, ტრანსლაციური მედიცინის და მათ შორის ფსიქიატრიის მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს ცხოველური მოდელის შერჩევა. ეს პროცესი რამდენიმე ეტაპს გულისხმობს, კერძოდ: (1) საცდელი ცხოველის; (2) მოდელირების მეთოდის და (3) მოდელის შემოწმების კრიტერიუმების შერჩევას. ფსიქიკურ აშლილობათა მოდელირებისათვის სხვადასხვა ცხოველის გამოყენებაა შესაძლებელი, თუმცა მათ შორის ყველაზე გამოყენებადს მიეკუთვნებიან:

ლაბორატორიული თაგვები (*Mus musculus*) — იდეალური მოდელია მრავალი ფსიქიკური აშლილობისათვის, მათ შორის, ისეთი დაავადებებისათვის როგორებიცაა პარკინსონის დაავადება, დეპრესია, აუტიზმი და სხვა. მათ ძირითად უპირატესობას წარმოადგენს ფასი, მცირე ზომა, ვირთაგვებთან შედარებით ნაკლებაგრესიულობა, გენური მოდიფიცირების საშუალება, ასევე შენახვისა და მოვლის სიმარტივე.

ლაბორატორიული თეთრი ვირთაგვები (*Rattus norvegicus*) — მიუხედავად იმისა, რომ მათი ფასი თაგვებთან შედარებით მაღალია, რიგი მანიპულაციების ჩატარება ვირთაგვაზე გაცილებით მარტივი (მაგ.

სისხლძარღვებთან მანი-პულაცია). ასევე, მათი უპირატესობაა მაღალი ინტელექტი, რაც საკმაოდ მნიშვნელოვანი თვისებაა ნეირომეცნიერებისათვის.

მინდვრის თაგვები (*Microtus ochrogaster*) — ეს ძალზედ საინტერესო მღრღნელები ნეირომეცნიერებაში გასული საუკუნის ბოლოს გამოჩნდნენ. მათზე წარმატებულად იქნა შესწავლილი ისეთი რთული ნეიროჰუმორული პროცესები, როგორიცაა მაგ. მონოგამიის მოლეკულური მექანიზმები, ოქსიტოცინისა და ვაზოპრესინის როლი სხვადასხვა სოციალურ აქტივობაში და სხვა. მათზე თავისუფლად შესაძლებელია დეპრესიის, აუტიზმის და სხვა ფსიქიკური აშლილობების შესწავლა, თუმცა ხელმისაწვდომობისა და ფასის თვალსაზრისით ცხადია, თაგვებსა და ვირთაგვებს ჯეროვნად ჩამოუვარდება, ამიტომ მასზე ძირითადად ისეთ ნეიროენდოკრინულ და ნეიროფსიქიატრიულ პროცესებს შეისწავლიან, რომელთა შესწავლა სხვა მღრღნელებზე შეუძლებელია.

ზებრა-თევზი დანო რერიო (*Danio rerio*) — დანო რერიო, რომელიც სულ მეტად პოპულარული ხდება ნეირომეცნიერებაში, აკვარიუმის, მომცრო ზომის თევზია. მიუხედავად იმისა, რომ მისი ნერვული სისტემა გაცილებით პრიმიტიულია მღრღნელთა და მითუმეტეს პრიმატთა ნერვულ სისტემაზე, მისი დაბალი ფასისა და გარკვეული თვალსაზრისით მუშაობის სიმარტივის გამო საკმაოდ გამოყენებადია. აღნიშნული ცხოველისათვის, დღესდღეობით შექმნილია დეპრესიის, ADHD-ს, აუტისტური სპექტრის აშლილობის და სხვა ზოგიერთი დაავადების მოდელი.

ხილის დროზოფილა (*Drosophila melanogaster*) — გენეტიკოსთა საყვარელი ობიექტი დროზოფილა, საკმაოდ მოსახერხებელი სამუშაოა გენეტიკასა და მოლეკულურ ბიოლოგიაში. ამდენად, ისინი ძირითადად ფსიქიკური აშლილობების, სწორედ გენეტიკური ასპექტების შესწავლისათვის გამოიყენება.

ნემატოდა (*Caenorhabditis elegans*) — 1მმ სიგრძის მრგვალი ჭია *C.elegans*, აქტიურად გამოიყენება ნეირობიოლოგიაში, განსაკუთრებით კი ემბრიოლოგიაში, როგორც კვლევის ობიექტი. მის ყველაზე დიდ უპირატესობას მიეკუთვნება ერთობ უცნაური თავისებურება — ყოველი ინდივიდი შედგება მაცკრად განსაზღვრული რაოდენობის, კერძოდ 959 უჯრედისაგან, ხოლო ამ უჯრედთაგან მუსტად 302 — ნეირონია.

§1.3 მოდელის ვალიდურობის შეფასება

ნებისმიერი კვლევის ჩატარებისას საკვანძოდ მნიშვნელოვანია მისი ვალიდურობის დადგენა, ვინაიდან ყოველთვის იბადება კითხვა „როგორ დავრწმუნდეთ, რომ მოდელი მუშაობს?!“ ამ კითხვას პასუხი 1984 წელს პ.ვილნერმა გასცა და ჩამოაყალიბა 3 კრიტერიუმი, რომლებიც ახლა „ვილნერის კრიტერიუმების“ სახელითაა ცნობილი. მაშ, რა კრიტერიუმებია ეს:

Face validity — ყველაზე ზედაპირული შეფასების კრიტერიუმი, რომელიც გულისხმობს ცხოველის სიმპტომების თანხვედრას რეალური დაავადების გამოვლინებასთან. ამ კრიტერიუმით შეფასების ძირითად ინსტრუმენტს წარმოადგენენ ქცევითი ტესტები, რომლებსაც ჩვენ მე-4 თავში განვიხილავთ (გვ.44-50)

Predictive validity — ვინაიდან მხოლოდ ქცევითი კრიტერიუმი არასაკმარისია მოდელის ვალიდურობის შესაფასებლად, საჭიროა მოდელირებული დაავადების სამკურნალო პრეპარატის გამოცდა ექსპერიმენტულ ცხოველებზე, ასეთის არსებობის შემთხვევაში. ვინაიდან, თუკი მოდელი იმეორებს დაავადების პათოგენეზს, შესაბამისი სამკურნალო საშუალებები უნდა მოქმედებდნენ მოდელის შემთხვევაშიც.

Constructive validity — მოდელის ვალიდობას საბოლოოდ სხვადასხვა ფიზიოლოგიური, ბიოქიმიური და მორფოლოგიური კვლევები ადასტურებენ. მაგალითისათვის, დეპრესიის მოდელის შემთხვევაში უნდა დაიკვირვებოდეს ისეთი მარკერები, როგორებიცაა სისხლში გლუკოკორტიკოსტეროიდების რაოდენობის მატება, მონოამინთა ცვლის შეფერხება და სხვა. ხოლო პარკინსონის დაავადებისას – დოფამინის რაოდენობის შემცირება, ასევე მორფო-ლოგიურად შავი სუბსტანციის ნეირონთა რაოდენობის შემცირება და ა.შ.

თავი II

ლაბორატორიული ცხოველების მოვლისა და მათზე ცდების ჩატარების შესახებ

წინამდებარე წიგნი დიდწილად ორიენტირებულია *In Vivo* კვლევების ჩატარების მეთოდოლოგიაზე, მოლეკულური ფსიქიატრიის კუთხით, თუმცა ნებისმიერი ამ ტიპის ცდის ჩატარებისათვის აუცილებელია მკვლევარი იცნობდეს იმ თანამედროვე სტანდარტებს, რომლებიც მკაცრად უნდა დაიცვას ლაბორატორიულ ცხოველებთან მუშაობისას. აღნიშნული თავი სწორედ ამ ტიპის ინფორმაციას მიაწვდის მკითხველს, ჩვენ შევცხებით ცხოველების მოვლის, შენახვის, ანესთეზიის, ეუთანაზიის საერთაშორისო ნორმებს. განვიხილავთ იმ ლაბორატორიულ ცხოველთა ფიზიოლოგიურ ნორმებს, რომლებსაც მკითხველი შემდგომ თავებში შეხვდება. ასევე მოკლედ შევცხებით მოლეკულური ფსიქიატრიის მთავარი კვლევის ობიექტის - თავის ტვინის მიღებისა და შენახვის მეთოდებს.

§2.1 ლაბორატორიულ ცხოველთა ფიზიოლოგიური ნორმები

§2.1.1 ლაბორატორიული თავგვები

(Suckow et al., 2023)

ქვევით მოცემულ ცხრილებში წარმოდგენილია ინფორმაცია იმ ძირითად ფიზიოლოგიურ მახასიათებლებზე, რომელთა შესახებაც თავგებთან მომუშავე მკვლევარმა აუცილებლად უნდა იცოდეს, როგორც ცხოველთა უფლებების დაცვის თვალსაზრისით, ისე ექსპერიმენტული კვლევის გამართულობის თვალსაზრისითაც.

ცხრილი 1. ზრდასრული ლაბორატორიული თავგის ზოგიერთი ბიოლოგიური პარამეტრი

პარამეტრი	ნორმა
დიპლოიდური ქრომოსომების რიცხვი (2N)	40
სიცოცხლის საშუალო ხანგრძლივობა	2-3 წელი
ზრდასრული ინდივიდის წონა	20-40გ
სხეულის ტემპერატურა	36.5-38°C
საკვების მოხმარება	12-18გ / 100გ სხეულის წონა
წყლის მოხმარება	15მლ / 100გ სხეულის წონა
სუნთქვის სიხშირე	80-230 ჩასუნთქვა/წთ
გულის ცემის სიხშირე	500-600 დარტყმა/წთ

ცხრილი 2. ზრდასრული ლაბორატორიული თავგის ლაბორატორიული მაჩვენებლების ნორმები

პარამეტრი	ნორმა
გლუკოზა	106-278 მგ/დლ
შარდოვანა აზოტი	19-34 მგ/დლ
კრეატინინი	0.5-0.8 მგ/დლ
ნატრიუმი	147-167 mEq/ლ
კალიუმი	5-9 mEq/ლ
ქლორი	104-120 mEq/ლ
კალციუმი	9-12 მგ/დლ
ფოსფორი	6-13 მგ/დლ
რკინა	210-474 მგ/დლ
ალანინ ამინოტრანსფერაზა	26-120 IU/ლ
ასპარტატ ამინოტრანსფერაზა	69-191 IU/ლ
ლაქტატ დეჰიდროგენაზა	26.8-34.4 mU/მლ
კრეატინკინაზა	2.5-3.7 IU/ლ
საერთო ცილა	43-64 გ/ლ
ალბუმინი	20-47 გ/ლ
ქოლესტეროლი	63-174 მგ/დლ
ტრიგლიცერიდები	71-164 მგ/დლ
საერთო ბილირუბინი	0.3-0.8 მგ/დლ

ცხრილი 3. ზრდასრული ლაბორატორიული თავგის შარდის ნორმალური მაჩვენებლები

პარამეტრი	ნორმა
მოცულობა	0.5-2.5 მლ/24სთ
pH	5.0
გლუკოზა	0.5-3.0 მგ/24სთ
ცილა	0.6-2.6 მგ/24სთ

ცხრილი 4. ზრდასრული ლაბორატორიული თავგის ჰემატოლოგიური ნორმები

პარამეტრი	ნორმა
PCV	38.5-45.1%
RBC	5.0-9.5 10^6 უჯრედი/ mm^3
ერიტროციტების დიამეტრი	5.5-6.0 მკმოლ
Hb	10.9-16.3 გ/დლ
MCV	48.0-56.0 ფლ
MCH	11.9-19.0 პგ
MCHC	25.9-35.1 გ/დლ
WBC	3.0-14.2 10^3 უჯრედი/ mm^3
ნეიროფილები	0.46-2.20 10^3 უჯრედი/ mm^3
ეოზინოფილები	0.00-0.38 10^3 უჯრედი/ mm^3
ბაზოფილები	0.00-0.09 10^3 უჯრედი/ mm^3
ლიმფოციტები	3.22-11.20 10^3 უჯრედი/ mm^3
მონოციტები	0.40-1.43 10^3 უჯრედი/ mm^3

ცხრილი 5. ზრდასრული ლაბორატორიული თავგის გალიის ზომების რეკომენდაციები

სხეულის წონა (გ)	გალიის ფსკერის ფართობი (cm^2)	გალიის სიმაღლე (სმ)
<10	38.7	12.7
15	51.6	12.7
25	77.4	12.7
>25	>96.8	12.7

ცხოველებთან მუშაობისას აუცილებელია მათი უმტკივნეულოდ და უსაფრთხოდ აყვანის ტექნიკის ცოდნა. არსებობს რამდენიმე ძირითადი მეთოდი: (1) კუდის ფუძით აყვანა (სურ. 1A); (2) კოხერის მომჭერით აყვანა (სურ. 1B); (3) პინცეტით აყვანა (სურ. 1C). კატეგორიულად არ შეიძლება მომჭერით აყვანა კუდით; ასევე კუდის კიდით აყვანა. ასევე შესაძლოა ხელით აყვანა არამარტო კუდით, არამედ კისრითაც. ეს უკანასკნელი, ყველაზე უმჯობესია და მინიმალურად მასტრესირებელი.



სურათი. 1 თავის აყვანის ხერხები

მღრღნელთა შენახვა ვივარიუმში, უნდა მოხდეს სპეციალური პირობების დაცვით (ცხრილი 6).

ცხრილი 6. მღრღნელების შენახვის პირობები

პარამეტრი	ნორმა
ტემპერატურა	18-26°C (საშუალოდ 22°C)
ცირკადული რიტმი	12:12 (სიბნელე/სინათლე)
გალის წმენდა (მინიმუმ)	1-2 კვირაში ერთხელ
საკვებისა და წყლის მიწოდება	<i>ad libitum</i>

§2.1.2 ლაბორატორიული პირთაგვები

(Suckow et al., 2019).

ცხრილი 7. ზოგიერთი ბიოლოგიური პარამეტრი

პარამეტრი	ნორმა
დიპლოიდური ქრომოსომების რიცხვი (2N)	42
სიცოცხლის საშუალო ხანგრძლივობა	2.5-3.5 წელი
ზრდასრული ინდივიდის წონა	250-300 გ (მდედრი) 450-520 გ (მამრი)
სხეულის ტემპერატურა	35.9-37.5°C
საკვების მოხმარება	5-6გ / 100გ სხეულის წონა
წყლის მოხმარება	10-12მლ / 100გ სხეულის წონა
სუნთქვის სიხშირე	70-115 ჩასუნთქვა/წთ
გულის ცემის სიხშირე	250-450 დარტყმა/წთ

ცხრილი 8. ლაბორატორიული მაჩვენებლების ნორმები

პარამეტრი	ნორმა
გლუკოზა	48-95 მგ/დლ
შარდოვანა აზოტი	11.0-23.0 მგ/დლ
კრეატინინი	0.4-1.4 მგ/დლ
ნატრიუმი	142-154 mEq/ლ
კალიუმი	3.6-9.2 mEq/ლ
ქლორი	84-110 mEq/ლ
კალციუმი	9.1-15.1 მგ/დლ
ფოსფორი	4.7-16 მგ/დლ
ალანინ ამინოტრანსფერაზა	52-224 IU/ლ
საერთო ცილა	4.5-8.4 გ/დლ
ალბუმინი	2.9-5.9 გ/დლ

ცხრილი 9. შარდის ნორმალური მაჩვენებლები

პარამეტრი	ნორმა
მოცულობა	0.5-2.5 მლ/24სთ
pH	5.0
გლუკოზა	0-10 მმოლ/ლ

ცხრილი 10. ჰემატოლოგიური ნორმები

პარამეტრი	ნორმა
PCV	35.0-57.0%
RBC	5.0-10 10^6 უჯრედი/მმ ³
ერიტროციტების დიამეტრი	5.5-6.0 მკმ
Hb	11.0-19.0 გ/დლ
MCV	46.0-65.0 ფლ
MCH	18.0-23.0 პგ
MCHC	31.0-40.0 გ/დლ
WBC	3.0-17 10^3 უჯრედი/მმ ³
ნეიროფილები	13.0-26.0 %
ეოზინოფილები	0.0-4.0 %
ბაზოფილები	0.0-1.0 %
ლიმფოციტები	65.0-83.0 %
მონოციტები	0.0-4.0 %

ბუნებრივია, მსგავსად თავგებისა, ვირთაგვებსაც გააჩნიათ შესაბამისი ნორმები გალიისათვის, რომელთა დაცვაც აუცილებელია! (ცხრილი 11).

ცხრილი 11. გალიის ზომების რეკომენდაციები

სხეულის წონა (გ)	გალიის ფსკერის ფართობი (სმ ²)	გალიის სიმაღლე (სმ)
<100	109.65	17.8
100-200	148.35	17.8
200-300	187.05	17.8
300-400	258.00	17.8
400-500	387.00	17.8
>500	≥451.5	17.8

ვირთაგვების აყვანა ხდება იმავე ტექნიკების გამოყენებით, რაც უკვე განხილულია ზევით, თაგვების შემთხვევაში (გვ. 14). ასევე, მსგავსად თაგვებისა, ვირთაგვების შენახვაც უნდა მოხდეს სპეციალური პირობების დაცვით (ცხრილი 12).

ცხრილი 12. გალიის ზომების რეკომენდაციები

პარამეტრი	ნორმა
ტემპერატურა	20-26°C (საშუალოდ 23°C)
ცირკადული რიტმი	12:12 (სიბნელე/სინათლე)
გალიის წმენდა (მინიმუმ)	კვირაში ერთხელ
საკვებისა და წყლის მიწოდება	<i>ad libitum</i>

§2.1.3 ლაბორატორიული ზეპრატივეზები (Danio rerio)

(Harper & Lawrence., 2011)

ცხრილი 13. ზოგიერთი ბიოლოგიური პარამეტრი

პარამეტრი	ნორმა
დიპლოიდური ქრომოსომების რიცხვი (2N)	50
სიცოცხლის საშუალო ხანგრძლივობა	3-5 წელი
ზრდასრული ინდივიდის წონა	70-270 მგ

ცხრილი 14. ლაბორატორიული მაჩვენებლების ნორმები

პარამეტრი	ნორმა
გლუკოზა	62.0-91.0 გ/დლ
კრეატინინი	0.5-0.9 მგ/დლ
კალიუმი	5.2-7.7 mEq/ლ
კალციუმი	12.3-18.6 მგ/დლ
ფოსფორი	20.3-24.3 მგ/დლ
ალანინ ამინოტრანსფერაზა	343.0-410.0 IU/ლ
საერთო ცილა	4.4-5.8 გ/დლ
ალბუმინი	2.7-3.3 გ/დლ
საერთო ბილირუბინი	0.2-0.6 მგ/დლ

ცხრილი 15. ჰემატოლოგიური ნორმები

პარამეტრი	ნორმა
ნეიროფილები	2.0-18.0 %
ეოზინოფილები	0.0-2.0 %
ბაზოფილები	0.0-2.0 %
ლიმფოციტები	71.0-92.0 %
მონოციტები	5.0-15.0 %

ცხრილი 16. ზებრა თევზის ონტოგენეზური განვითარების ეტაპები

დრო განაყოფიერებიდან	განვითარების ეტაპი
0-72 სთ	ემბრიონი (<i>Embryos</i>)
72სთ - 13 დღე	ადრეული ლარვა (<i>Early Larvae</i>)
14-29 დღე	შუახნის ლარვა (<i>Mid Larvae</i>)
30დღე - 3/4 კვირა	მოზარდი (<i>Juveniles</i>)
>4 კვირა	ზრდასრული (<i>Adult</i>)

ცხრილი 17. აკვარიუმის ზომებისა და წყლის პარამეტრების რეკომენდაციები

ინდივიდი	წყლის მოცულობა
20 კვრცხი/ემბიონი	100 მლ
20 ახალგაზრდა ლარვა	400 მლ
1-5 მოზარდი	1000-2000 მლ
25 ზრდასრული თევზი	25 000-45 000 მლ

გებრა თევზების შენახვა უნდა მოხდეს სპეციალური პირობების დაცვით (ცხრილი 18)

ცხრილი 18. გებრათევზის შენახვის პირობები

პარამეტრი	ნორმა
ტემპერატურა	25-28°C
ფოტოპერიოდი	14:10 (სინათლე/სიბნელე)
pH	6-8
ჟანგბადის შემცველობა	6.0 ppm

§2.2 ანესთეზიის მეთოდები და დოზები

§2.2.1 ანესთეზიის მეთოდები და დოზები თაგვებისა და ჰირთაგვებისათვის

მრავალი ექსპერიმენტული მოდელი საჭიროებს იმგვარ ჩარევას, რომელიც მოითხოვს ცხოველის ანესთეზირებას. აღნიშნული პროცესი საჭიროებს არამხოლოდ სწორი პრეპარატისა და დოზის შერჩევას, არამედ ცხოველის მუდმივ მონიტორინგს, კერძოდ, მისი სასიცოცხლო პარამეტრების: გულისცემა, სუნთქვის სიხშირე, სხეულის ტემპერატურა და სხვა. ყურადსაღებია, რომ ანესთეზიის ქვეშ მყოფ ცხოველში შესაძლოა დაიკვირვებოდეს სუნთქვის სიხშირის 50%-მდე დაქვეითება რაც ნორმალურია. ასევე მნიშვნელოვანია ცხოველის მონიტორინგი ანესთეზიის შემდგომ, სრულ გამოსვლამდე მინიმუმ ყოველ 10-15 წუთში. იმ შემთხვევაში თუ ცხოველის მდგომარეობა დამძიმდა და მაგალითად სახეზეა გულის გაჩერება, საჭიროა ცხოველს ჩაუტარდეს ერთიმხრივ, გულის მასჟი ცერა თითის მეშვეობით, მეორესმხრივ კი ფარმაკოლოგიური დახმარება, კერძოდ: დოქსაპრამი (doxapram), დოზით 5-10მგ/კგ ინტრავენურად ან კანექვეშ. სწორი პრეპარატისა და დოზის შერჩევისათვის შეგიძლიათ იხელმძღვანელოთ ქვევით მოცემული ცხრილით (ცხრილი 19).

ცხრილი 19. საანესთეზიო საშუალებების გამოყენების დოზები

ნივთიერება		დოზა
ანტიქოლინერგული პრეპარატები		
ატროპინი (<i>Atropine</i>)		0.05–0.10 მგ/კგ S.C
გლიკოპიროლატი (<i>Glycopyrrolate</i>)		0.01 – 0.02 მგ/კგ S.C
საინჰალაციო პრეპარატები		
იზოფლურანი (<i>Isoflurane</i>)		4–5% C.V
იზოფლურანი (<i>Isoflurane</i>)		300მკლ მარლაზე, განთავსებული 500მლ –იან კონტეინერში
სევოფლურანი (<i>Sevoflurane</i>)		4–7% C.V
საინექციო პრეპარატები		ხანგრძლივობა
კეტამინი (<i>Ketamine</i>) + ქსილაზინი (<i>Xylazine</i>)	80–120 მგ/კგ IP + 5–10 მგ/კგ IP	30–45 წთ
კეტამინი (<i>Ketamine</i>) + ქსილაზინი (<i>Xylazine</i>) + აქცეპრომაზინი (<i>Acepromazine</i>)	80–120 მგ/კგ IP + 5–10 მგ/კგ IP + 1 მგ/კგ IP	40 წთ
კეტამინი (<i>Ketamine</i>) + დექსმედეტომიდინი (<i>Dexmedetomidine</i>)	50–75 მგ/კგ IP + 0.5–5 მგ/კგ IP	20–30 წთ
ბარბიტურატები		ხანგრძლივობა
პენტობარბიტალი (<i>Pentobarbital</i>)	30–40 მგ/კგ IP (სედაციისთვის) 40–60 მგ/კგ IP (ანესთეზიისთვის)	10–300 წთ
პროპოფოლი (<i>Propofol</i>)	12–26 მგ/კგ IV	5–7 წთ
საინექციო სედაციური პრეპარატები		
კეტამინი (<i>Ketamine</i>) + დიაზეპამი (<i>Diazepam</i>) (იმობილიზაციისა და სედაციისათვის)	100 მგ/კგ IP + 5 მგ/კგ IP	20–30 წთ
კეტამინი (<i>Ketamine</i>) + მიდაზოლამი (<i>Midazolam</i>) (იმობილიზაციისათვის)	100 მგ/კგ IP + 5 მგ/კგ IP	20–30 წთ
კეტამინი (<i>Ketamine</i>) + აქცეპრომაზინი (<i>Acepromazine</i>)	100 მგ/კგ IP + 5 მგ/კგ IP	20–30 წთ

ლოკალური ანესთეტიკური საშუალებები		
ლიდოკაინი (<i>Lidocaine</i>)	4 მგ/კგ S.C; 0.4 მლ/კგ, 1%	1.5-2 სთ
ბუპივაკაინი (<i>Bupivacaine</i>)	0.4-2 მგ/კგ S.C; 0.4-0.8 მლ/კგ, 0.25%	4-12 სთ
ანალგეტიკური საშუალებები		
ბუპრენორფრინი (<i>Buprenorphine</i>)	0.05-0.1 მგ/კგ S.C	4-8 სთ
კარპროფენი (<i>Carprofen</i>)	5 მგ/კგ S.C/I.P	24 სთ
ფლუნიქსინი (<i>Flunixin</i>)	2.5 მგ/კგ S.C	12-24 სთ
მელოქსიკამი (<i>Meloxicam</i>)	1-2 მგ/კგ Per Os	12-24 სთ
კეტოპროფენი (<i>Ketoprofen</i>)	2-5 მგ/კგ S.C	12-24 სთ
* CV – Calibrated Vaporizer (კალიბრირებული ამორთქლებელი)		

§2.2.2 ანესთეზიის მეთოდები და დოზები ზეპრათეზვებისათვის

ბუნებრივია, გებრა თევზისთვისაც არსებობს შემთხვევები, როდესაც საჭირო ხდება ცხოველების ანესთეზირება. ამისათვის არსებობს FDA¹-ის მიერ დამტკიცებული მხოლოდ ერთი პრეპარატი — Finquel, იგივე ტრიკაინ მეთან-სულფონატი (*Tricaine methanesulfonate*), ასევე ცნობილი, როგორც MS-222, TMS, MESAB, Ethyl-3-aminobenzoate, ან 3-amino benzoic acid ethyl ester. აღნიშნული პრეპარატი მჟავა ბუნებისაა, ამიტომ მისი გამოყენება ხდება სპეციალური მეთოდით, კერძოდ, MS-222 იხსნება ნატრიუმის ბიკარბონატთან ერთად შეფარდებით 1:2 და ბიკარბონატივით მიიყვანება pH -ის მაჩვენებელი 7-7.5 -მდე. დოზის შერჩევის პრინციპისათვის იხ. ცხრილი 20.

ცხრილი 20. საანესთეზიო დოზები

ეფექტი	დოზა
სედაცია	15-50 მგ/ლ
ინდუქცია	50-200 მგ/ლ
შენარჩუნება	50-100 მგ/ლ

¹ FDA — Food and Drug Administration

ცხრილი 21. საანესთეზიო ხსნარების შენახვის ვადები და პირობები

ხსნარი	კონცენტრაცია	შენახვის ვადა	შენახვის პირობები
სამუშაო ხსნარი	40მკგ/მლ	---	---
საწყისი ხსნარი	10მკგ/მლ (1%)	4 კვირა	4°C
კონცენტრირებული საწყისი ხსნარი	100მკგ/მლ (10%)	6 თვე	-20°C
კონცენტრირებული საწყისი ხსნარი	100მკგ/მლ (10%)	10 დღე	RT°C

§2.3 ექთანაზიის მეთოდები ლაბორატორიული ცხოველებისთვის

მოლეკულური ფსიქიატრიის მიმართულების კვლევაში, უხშირესად აუცილებელია ექსპერიმენტული ცხოველიდან ამ სფეროს კვლევის მთავარი ობიექტის თავის ტვინის (ან სხვა შინაგანი ორგანოს) მიღება, რისთვისაც საჭიროა ცხოველის დეკაპიტაცია. ამისათვის კი, თავის მხრივ საჭიროა მოხდეს ცდის ობიექტის ექთანაზია, ანუ მაქსიმალურად უმტკივნეულოდ და უტანჯველად სიცოცხლის შეწყვეტა. თავად ტერმინი „ექთანაზია“ ბერძნული წარმოშობისაა და ითარგმნება, როგორც eu – სიკეთე, thanatos – სიკვდილის ღმერთი. მაშასადამე აუცილებელია არსებობდეს ერთიანი სახელმძღვანელო, გნებავთ ინსტრუქცია, გაიდლაინი, რომლითაც მეცნიერები მთელი მსოფლიოს მასშტაბით შეძლებენ ხელმძღვანელობას. არსებობს რამდენიმე ასეთი გაიდლაინი, თუმცა ქრესტომატიული და საერთაშორისოდ აღიარებულია ამერიკის ვეტერინარული მედიცინის ასოციაციის (American Veterinary Medical Association), იგივე **AVMA გაიდლაინი**. ქვევით მოცემული მეთოდებიც სწორედ მას ეფუძნება.

§2.3.1 ექთანაზია ლაბორატორიულ მღრღნელებში

- 1. ბარბიტურატები და ბარბიტურის მჟავას დერივატები** — ბარბიტურატების ინექცია, ძირითადად ინტრაპერიტონეური, უმტკივნეულო და ჰუმანურ მეთოდადაა აღიარებული. ბარბიტურატების დოზა 3-ჯერ უნდა აღემატებოდეს საანესთეზიო დოზას. უხშირესად, გამოიყენება პენტობარბიტალის ინტრაპერიტონეური ინექცია. ასევე, იმდენად, რამდენადაც ბარბიტურატების ინექცია შესაძლოა იყოს მტკივნეული, რეკომენდებულია მისი გამოყენება ლოკალურ საანესთეზიო საშუალებებთან ერთად.
- 2. დისოციაციური აგენტები** — კეტამინის და სხვა დისოციაციური პრეპარატების გამოყენება ალფა2 ადრენორეცეპტორების აგონისტებთან კომბინაციაში ასევე მიიჩნევა მიღებულ მეთოდად.
- 3. ჰალოგენირებული ანესთეტიკები** — ჰალოტანი, იზოფლურანი, სევოფლურანი NO-სთან ერთად ან მის გარეშე ასევე მიღებულია ჰუმანურ მეთოდად.
- 4. CO₂** — ნახშირორჟანგის ინჰალაცია ოპტიმალურია 30-70% გალიის მოცულობა/წუთში.
- 5. ეთანოლი** — 70-100% -იანი ეთანოლის ინტრაპერიტონეური ინექცია თავგებში მოცულობით 0.5მლ მოცულობით აპრობირებული მეთოდია.
- 6. დეკაპიტაცია** — დეკაპიტაცია გილიოტინის მეშვეობით დასაშვებია, თუკი დეკაპიტაცია მოხდება არაუხანგრძლივს 30 წამისა.

§2.3.2 ექთანაზია ლაბორატორიულ ზეპრათქვევებში

ზეპრა თევზის ექთანაზიისათვის მიღებულია იმავე პრეპარატის გამოყენება, რაც გამოიყენება მათი ანესთეზიისათვის - MS-222 თევზების ჩაძირვიდან 30 წუთის განმავლობაში. ოპტიმალური დოზაა 250-500 მგ/ლ.

§2.4 ინექციების მეთოდოლოგია ლაბორატორიულ ცხოველებში

§2.4.1 ფარმაცევტული კალკულაციის გომიერთი საკითხი

პარენტერალური პრეპარატების განზავება

განუზავებელი პრეპარატის მოცულობა x განუზავებელი პრეპარატის კონც. = საბოლოო სრული მოცულობა x განზავებული საბოლოო კონცენტრაცია

მაგ:

კეტამინის განუზავებელი კონცენტრაცია = 100მგ/მლ

კეტამინის განზავებული კონცენტრაცია = 10მგ/მლ

საბოლოო მოცულობა = 10მლ

=> 1მლ საწყისი ხსნარი + 9მლ ფიზ. ხსნარი

ინტრავენური პრეპარატების განზავება

საბოლოო მოცულობა უნდა უტოლდებოდეს საინექციო ხსნარის პაკეტის მოცულობას.

მაგ:

საინექციო ხსნარია 1000მლ რინგერის ლაქტატის ხსნარი (LRS)

გლუკოზას საწყისი კონცენტრაცია = 50%

გლუკოზას საბოლოო კონცენტრაცია = 5% (0.05გ/მლ LRS)

მაშასადამე, საბოლოო ხსნარია 1000მლ 5% გლუკოზა LRS -ში

=> 900მლ LRS + 100მლ 50% გლუკოზა

ორი ან მეტი პრეპარატის კომბინირება

$$\text{Vol.A} \times [\text{A}] = \text{Final Vol.A} \times \text{Final} [\text{A}] + \text{Vol.B} \times [\text{B}] = \text{Final Vol total} \times \text{Final} [\text{B}]$$

სადაც:

Vol.A — პრეპარატი A-ს საჭირო მოცულობა

[A] — პრეპარატი A-ს საჭირო კონცენტრაცია

Final Vol.A — პრეპარატი A-ს განზავებული ხსნარის საბოლოო მოცულობა

Final [A] — პრეპარატი A-ს საბოლოო კონცენტრაცია განზავებულ ხსნარში

Vol.B — პრეპარატი B-ს საჭირო მოცულობა

[B] — პრეპარატი B-ს საჭირო კონცენტრაცია

F. Vol total — განზავებული ხსნარის საბოლოო ჯამური მოცულობა

Final [B] — პრეპარატი B-ს საბოლოო კონცენტრაცია

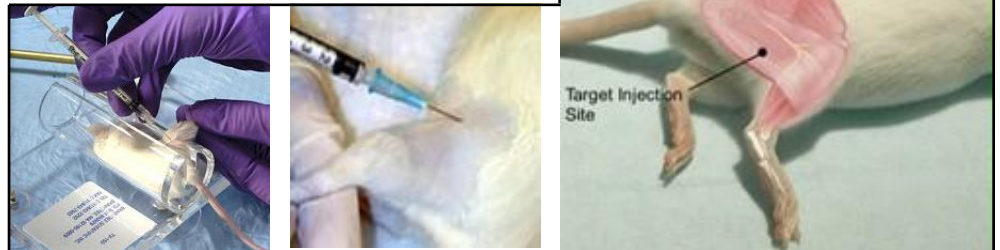
§2.4.2 ინექციების ტექნიკური დეტალები

საჭირო ინსტრუმენტები და რეაქტივები:

1. ეთანოლი 70%
2. ბამბა
3. შპრიცი და ნემსი
4. შემაკავებელი (საფიქსაციო) დანადგარი (სასურველია)

ინტრამუსკულური ინექცია (IM)

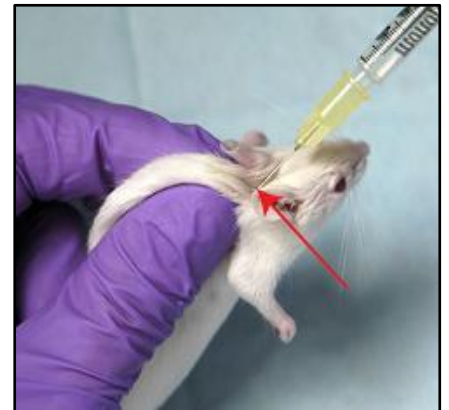
მოათავსეთ ცხოველი საფიქსაციო აპარატში და ფროთხილად გამოუთავისუფლეთ ფეხი და კუდი (თუ ასეთი აპარატი არ მოგეპოვებათ შესაძლებელია ფიქსაცია განახორციელოს ასისტენტმა); ინექცია უნდა მოხდეს 90°-იანი კუთხით, ბარძაყში, კაუდალურად, ისე, რომ არ დაზიანდეს ნერვი (სურ. 2)



სურათი 2. რამდენიმე მითითება ინტრამუსკულატული ინექციებისათვის

კანქვეშა ინექცია (SC)

ცხოველი უნდა დაფიქსირდეს კისრით, წამოიწიოს კანი და მოხდეს საინექციო არის დამუშავება 70% -იანი ეთანოლით. ინექცია უნდა გაკეთდეს სხეულის პარალელურად, კაუდალური მიმართულებით (სურ. 3)



სურათი 3. კანქვეშა ინექცია

ინტრაპერიტონეული ინექცია (IP)

მღრღნელი უნდა დაფიქსირდეს კისრით, თავისუფალი თითის ან ასისტენტის საშუალებით კი დაფიქსირდეს ქვედა თათი, რათა მუცლის არე იყოს „გახსნილი“ შემდგომი ინექციებისათვის. ინექცია უნდა გაკეთდეს მუცლის ქვედა ლატერალურ (მარჯვენა ან მარცხენა) კვადრატში, ნემსის 30° -იანი კუთხით. (სურ. 4)



სურათი 4. ინტრაპერიტონული ინექცია

ინტრავენური ინექცია (IV)

რიგი ავტორები მიუთითებენ, რომ სასურველია ინექციებამდე ცხოველების გათბობა ლამპის საშუალებით, ისე, რომ ცხოველის დონეზე ტემპერატურა არ აღემატებოდეს 29-32°C (85-90°F). გათბობის პროცედურა უნდა შეწყდეს თუკი შეიმჩნევა ცხოველის სუნთქვის, გულის ცემის ან ნერწყვგამოყოფის საგრძნობი გახშირება. ამის შემდგომ, ცხოველი უნდა მოთავსდეს ფიქსატორში, მისი კუდი კი უნდა დაფიქსირდეს ორი თითის საშუალებით და დამუშავდეს 70% -იანი ეთანოლით. მოჭიმულ მდგომარეობაში, დაახლოებით კუდის შუა დონეზე უნდა მოხდეს ჩხვლეტა არაუმეტეს 3მმ სიღრმით. დაუშვებელია ასპირაცია, რათა თავიდან იქნეს არიდებული ვენის კოლაფსი. პრეპარატი უნდა შეიყვანოს ნელა, ხოლო იმ შემთხვევაში თუ გამოიხატება წინააღმდეგობა, საჭიროა დაუყოვნებლივ შეწყდეს ინექციების პროცედურა, და მოხდეს ნემსის ხელმეორედ ჩხვლეტა. (სურ. 5)



სურათი 5. ინტრავენური ინექცია

ცხრილი 22. ინექციის მაქსიმალური მოცულობები და ნემსის პარამეტრები

ცხოველი	IM	IP	IV	SC
თაგვი	<0.05მლ	<2-3მლ	<0.2მლ	<2მლ
	<23G	<21G	<25G	<20G
ვირთაგვა	<0.3მლ	<5-10მლ	<0.5მლ	<5მლ
	<21G	<21G	<23G	<20G

თავი III

ნევროლოგიურ და ფსიქიკურ აშლილობათა მოდელირების მეთოდები

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ტრანსლაციური მოდელირება ფსიქიატრიის, ნეიროფსიქიატრიის, ფსიქოფარმაკოლოგიისა თუ ფსიქოფიზიოლოგიის განვითარების ქვაკუთხედს წარმოადგენს. აღნიშნულ თავში ჩვენ გავცნობით მოლეკულური ფსიქიატრიისათვის განსაკუთრებული მნიშვნელობის მქონე ბოგიერთი ფსიქიკური აშლილობის მოდელირების ისეთ მეთოდებს, რომელთა ტრანსლაციის ობიექტადაც აღებულია ლაბო- რატორიული თავვი ან ვირთავვა, ხოლო გამომწვევად კი ქიმიური ნაერთი — ტოქსინი. ამ დაავადებებს შორისაა ნეიროდეგენერაციულ დაავადებათა ორი წარმომადგენელი: ალცჰაიმერისა და პარკინსონის დაავადებები; ფსიქოზური აშლილობებიდან — შიზოფრენია; ნევროზული აშლილობებიდან — ობსესიურ- კომპულსიური აშლილობა და ე.წ. ADHD; აფექტური აშლილობებიდან — დეპრესია; ასევე აუტისტური სპექტრის აშლილობა. თავისთავად ცხადია, ქვემოთ განხილული მეთოდები არებულია მხოლოდ მცირე ნაწილია, თუმცა ჩვენ შევეცადეთ შეგვეჩინა ყველაზე აქტუალური და ხელმისაწვდომი მეთოდები.

§3.1 ნეიროდეგენერაციული დაავადებები

ნეიროდეგენერაციული დაავადებები წარმოადგენს ნევროლოგიური დარღვევების ჰეტეროგენულ ჯგუფს, რომელიც ხასიათდება ცენტრალური ან პერიფერიული ნერვული სისტემის ნეირონთა პროგრესული კვდომით. უკანასკნელი ათწლეულების ბაზისური, ტრანსლაციური და კლინიკური კვლევების საფუძველზე გამოვლენილია ბიოქიმიური პროცესები და გენეტიკური ფაქტორები, რომელიც საფუძვლად უდევს ამ დარღვევებს. შედეგად გამოიკვეთა 8 წამყვანი ნიშანი: პროტეინების პათოლოგიური აგრეგაცია, სინაფსურ და ნეირონალურ ქსელთა დისფუნქცია, აბერანტული პროტეოსტაზი, ციტოსკელეტური დარღვევები, დარღვეული ენერგეტიკული ჰომეოსტაზი, დნმ და რნმ-ის დეფექტები, ანთება და ნეირონთა კვდომა (Wilson DM 3rd et al., 2023) დაავადებათა აღნიშნული ჯგუფი მრავალ დაავადებას აერთიანებს, მათ შორის ალცჰაიმერის, პარკინსონის, ჰანტინგტონის, პიკის დაავადებებს, ასევე კორტიკობაზალურ დეგენერაციას და ა.შ. მათი მოდელირებისათვის გამო- იყენება მრავალი გენეტიკური, ოპერაციული თუ ქიმიო-ტოქსიკური მოდელები. ჩვენ სწორედ ამ უკანასკნელზე შევიჩერდებით.

§3.1.1 ალცჰაიმერის დაავადება

ალცჰაიმერის დაავადება (Alzheimer's disease), ნეიროდეგენერაციულ დაავადებათა ჯგუფის ყველაზე გავრცელებული პათოლოგიაა. თუმცა იგი შეიძლება შეგვხვდეს ახალგაზრდა პირებში, ალცჰაიმერის დაავადება ძირითადად არის ასაკოვანთა დაავადება. იგი უპირატესად მესხიერებასა და დასწავლის (კოგნიტურ) უნარებს აზიანებს, რაც განპირობებულია პათოლოგიური პროცესით, რომელსაც ორი დამახასიათებელი ნიშანი გააჩნია: უჯრედგარეთა სივრცეში ბეტა ამილოიდის ფოლაქების (Amyloid plaques) დაგროვება და უჯრედშიდა სივრცეში კი ნეიროფიბრილური გორგლების (Neurofibrillary tangles) დაგროვება, რომელიც ტაუ (tau) პროტეინისაგან შედგება. ალცჰაიმერის დაავადების პათოფიზიოლო- გიური მექანიზმი მდგომარეობს შემდეგში: ცნობილია, რომ თავის ტვინის ნეირონთა პლაზმურ მემბრანაზე აღმოჩენილია ტრანსმემბრანული ცილების ჯგუფი, რომლებსაც APP ანუ ამილოიდის წინამორბედ ცილებს (Amyloid Precursor Proteins) უწოდებენ. ეს ცილები 695-700 ამინომჟავური ნაშთისაგან შედგება და მათ ძირითად ფუნქციას, როგორც სჩანს, ნეირონის დაცვა და მისი დაზიანების შემთხვევაში აღდგენის პროცესში მონაწილეობა წარმოადგენს. რასაკვირველია, როგორც სხვა ცილები, APP -ც დროთა განმავლობაში უნდა დაიშალოს. ამ პროცესს უზრუნველყოფს ორი ფერმენტი: ალფა-სეკრეტაზა და გამა-სეკრეტაზა. ამ ფერმენტების მოქმედების შედეგად APP- ცილისაგან წარმოიქმნება შედარებით დაბალმოლეკულური, ხსნადი ფრაგმენტები. ეს ცილები ხსნადობას იძენენ და ტოვებენ ნეიროლემას. გაურკვეველი მიზეზით ალფა სეკრეტაზას ნაცვლად პროცესში ერთვება სხვა ფერმენტი, კერძოდ , ერთვება ბეტა- სეკრეტაზა, რომელიც არასწორედ ახდენს ამილოიდის წინამორბედი ცილის ფრაგმენტაციას, რის შედეგადაც მიიღება

მონომერები, რომელსაც უწოდებენ ბეტა ამილოიდს (A β). ეს უკანასკნელი არ წარმოადგენს ტვინისათვის საშიშროებას და კიდევაც სტიმულირებს კოგნიტურ პროცესებს, მაგრამ მას მისნაირი პეპტიდების მიზიდულობის დიდი უნარი გააჩნია. და ამ გზით გაერთიანებული უხსნადი დიმერები და ოლიგომერები უჯრედგარე სივრცეში ხვდება და უკვე წარმოადგენენ საშიშროებას ტვინის

ქსოვილისათვის. დემენციის ამილოიდური ჰიპოთეზა სრულად ვერ პასუხობს დემენციის წარმოშობის კითხვას, რადგან კვლევებმა აჩვენა, რომ კოგნიტურად ნორმალურ ასაკოვან პოპულაციაშიც აღმოაჩინეს გამოხატული ბეტა ამილოიდური პათოლოგია (Bennett DA et al., 2006; Morris et al., 2010, Jagust W, 2016). ამჟამად გამოითქვა მოსაზრება, რომ ბეტა ამილოიდი უარყოფითად მოქმედებს ტვინის ქსოვილზე ტაუ პროტეინის ნორმალურიდან ტოქსიურ მდგომარეობაში გარდაქმნის მეშვეობით (Bloom GS, 2014; Stancu IC et al., 2014). კერძოდ, უჯრედგარე სივრცეში დაგროვილი ბეტა ამილოიდი უკავშირდება ალფა-2A ადრენორეცეპტორებს და მოდულირებს მის აქტივობას. რეცეპტორი ჭარბად ააქტივებს სასიგნალო გზას, რომელშიც ჩართულია ფერმენტი გლიკოგენსინთაზაკინაზა (GSK3 β) (Zhang F et al., 2020). ამის შედეგად, ნეირონში ხდება tau ცილების ჰიპერფოსფორილირება. ჩვეულებრივ, ტაუ ცილები უზრუნველყოფენ მიკროტუბულების, მაშასადამე ციტოჩონჩხის მდგრადობას. ჰიპერფოსფორილირება კი იწვევს ამ ცილების ფუნქციურ რღვევას, მათ აგრეგაციას და ნეიროფიბრილური გორგლების წარმოქმნას, რაც თავის

მხრივ ნეირონთა აპოპტოზის მიზეზი ხდება (Iqbal K et al., 2010; Chakraborty P et al., 2024). გარდა ამისა, ვინაიდან A β მარტივად უკავშირდება ერთმანეთს და ნეირონის გარეთ წარმოქმნიან ე.წ. ამილოიდურ ბალთებს ანუ ფოლაქებს, ისინი თავსდებიან ნეირონთა შორის და ხელს უშლიან ნერვული იმპულსის ნორმალურ გადაცემას. ბეტა ამილოიდური ფოლაქები შესაძლოა გახდნენ ამილოიდური ანგიოპათიის მიზეზიც, იმდენად, რამდენადაც მათ აქვთ უნარი დაგროვდნენ სისხლძარღვის კედლის გარშემო, რაც თავისთავად ზრდის ჰემორაგიის რისკს. უკანასკნელ წლებში გამოვლინდა, რომ პრესენილინები (PS1 და PS2) მოდულირებს ენდოპლაზმური დეპოებიდან კალციუმის იონების გამოთავისუფლების პროცესს. მიუხედავად იმისა, რომ უშუალოდ პრესენილინებში არ აღინიშნება Ca²⁺-დამაკავშირებელი უბნების არსებობა, მათ შეუძლიათ ურთიერთქმედება კალციუმისადმი მგრძნობიარე ცილებთან — კალსენილინთან, სორცინთან და კალბინდინთან. კალციუმის უჯრედშიდა ჰომეოსტაზის ამ ტიპის რეგულირება არღვევს ნეირონებში გლუტამატის შთანთქმის პროცესს, რაც იძლევა საშუალებას ვივარაუდოთ, რომ სასიგნალო Ca²⁺-ის დესტაბილიზაცია მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ნეირონების დაღუპვაში და ალცჰაიმერის დაავადების განვითარებაში (Galla L et al., 2020). ეს კასკადი გამოკვეთილია ოჯახური დემენციის შემთხვევებში, სადაც ნანახია პრესენილინების გენების (PSEN1 და PSEN2) მუტაციის ექსპრესია (Nelson E et al., 2010). ალცჰაიმერის დაავადების მიმდინარეობაში ასევე მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს მიტოქონდრიულ დისფუნქციასა და ოქსიდაციურ სტრესს. პათომორფოგენების თვალსაზრისით, ალცჰაიმერის დაავადება ხასიათდება ტვინის დიფუზური ატროფიით, თანმდევი ტვინის მასის 18-20% -ს შემცირებით. ატროფია მოიცავს შუბლის, საფეთქლის, თხემის წილებს. აღინიშნება მესამე და გვერდითი პარაკუჭების სიმეტრიული გაფართოვება.

ალცჰაიმერის დაავადების მოდელირებისათვის არც თუ იშვიათად გამოიყენება ისეთი მეთოდები, როგორიცაა გენურად მოდიფიცირებული ცხოველები, თუმცა ქართულ რეალობაში აღნიშნული ძალიან შეზღუდულადაა ხელმისაწვდომი, ამიტომ მეტად საყურადღებოდ მიგვაჩნია ე.წ. ნეირო-ტოქსიკური მოდელები. მათ შორის, მძიმე მეტალებით, სკოპოლამინით, კოლხიკინითა და სტრეპტოზოტოცინით ინდუცირებული პათოლოგიები (Chen & Zhang, 2022; Drummond & Wisniewski, 2017; Esquerda-Canals et al., 2017; Kosel et al., 2020; Puzzo D et al., 2015).

§3.1.1.1 ალუმინით (Al) ინდუცირებული მოდელი

ცნობილია, რომ ალცჰაიმერის გამომწვევ ერთ-ერთ მნიშვნელოვან აგენტებს წარმოადგენენ მძიმე მეტალები. საზოგადოდ ცნობილია მათი ურთიერთკავშირი ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებთან. მაგალითად, ნანახია ალუმინის (Al) მაღალი დოზები ალცჰაიმერით დაავადებულ პირთა თავის ტვინში (Wang Z et al., 2016). თუმცა დიდი ხანია განიხილება მოსაზრება, რომ ალუმინი ხელს უწყობს ბეტა ამილოიდის ოლიგომერიზაციას და ამით ზრდის ბეტა-ამილოიდის ნეიროტოქსიურობას, რაც 'ამილოიდური კასკადის ჰიპოთეზის' თანახმად წარმოადგენს ალცჰაიმერის დაავადების წარმოქმნის მიზეზს, პირდაპირი კავშირი სასმელი წყლით ალუმინის მიღებისა და ალცჰაიმერის დაავადების რისკთან არ დასტურდება (Kawahara M & Kato-Negishi M, 2011; Van Dyke et al., 2021). ექსპერიმენტალურ მოდელებში აღმოჩნდა, რომ პერ ორალურად მიწოდებული ალუმინი ალცჰაიმერის დაავადების საკმაოდ კარგი მეთოდია (Fernandes RM et al., 2020). როგორც წესი, გამოიყენება Al დოზით 50მგ/კგ, სამჯერ კვირაში, 90 დღე, Per Os; ან ალუმინის ქლორიდი (AlCl₃), 10-300მგ/კგ, Per Os, 20-60დღე. (ცხრილი 23).

§3.1.1.2 სკოპოლამინით (Scopolamine) ინდუცირებული მოდელი

სკოპოლამინი (Scopolamine) ანტიქოლინერგული პრეპარატია, რომელიც ნეირომეცნიერებაში გამოიყენება, როგორც მეხსიერებისა და დასწავლის უნარების დარღვევების გამომწვევი ნივთიერება. მას ფართო გამოყენება აქვს მედიცინასა (ანტიემეტური საშუალება) და სოფლის მეურნეობაში (სასუქი).

ნანახია, რომ იგი ჰიპოკამპის ნეირონებში იწვევს აცეტილქოლინის არათანაბარ გამონთავისუფლებას, რაც საბოლოო ჯამში იწვევს მათ კვდომას. აღნიშნული მეთოდი ვალიდურია, როგორც მღრღნელებში, ისე თევზებში მოდელირებისათვის. ზოგჯერ მასთან ერთად გამოიყენება შავი კვლიავის (*Black seed oil*) ზეთიც, რომელიც დადგენილია, რომ იწვევს ამოლოიდოპათიას. (ცხრილი 23)

§3.1.1.3 კოლხიციანი (Colchicine) ინდუცირებული მოდელი

კოლხიციანი (Colchicine) ალცჰაიმერის დაავადების მოდელირებაში ახალი სიტყვაა, იგი თრგუნავს ქოლინერგულ გამტარ გზებს და იწვევს ჰიპოკამპის დაზიანებას, თანმდევი მეხსიერებისა და დასწავლის უნარების დარღვევით. იგი ამავედროულად მოქმედებს მონოამინურ სისტემებზეც ჰიპოკამპში, კუდიან ბირთვსა (nucleus caudatus) და ნეოკორტექსში. ამასგარდა, ნანახია, რომ კოლხიციანი იწვევს ჟანგბადის აქტიური ფორმების (ROS) წარმოქმნის გაძლიერებას და ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტების რაოდენობის შესაბამის ზრდას. მას ასევე უკავშირებენ ციკლოოქსიგენაზა 1 და 2 -ის აქტივობის გაზრდასაც. კოლხიციანი, როგორც ალცჰაიმერის დაავადების ანალოგიური მდგომარეობის გამომწვევი პრეპარატი გამოიყენება დოზებით 6-15მკგ/2-5მკლ, ინტრაცერებროვენტრიკულურად (ICV). (ცხრილი 23)

§3.1.1.4 სტრეპტოზოტოცინი (Streptozotocine) ინდუცირებული მოდელი

სტრეპტოზოტოცინი (Streptozotocine) ცნობილი სიმსივნის საწინააღმდეგო პრეპარატია, რომელიც პანკრეასის არაოპერირებადი სიმსივნის სამკურნალო ქიმიოთერაპიულ პრეპარატად გამოიყენება. ნანახია, რომ იგი იწვევს ჟანგბადისა და აზოტის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნას (ROS და RNS). ასევე რიგი ფერმენტების ინჰიბირების გზით ამცირებს ATP -ისა და კრეატინ-ფოსფატის რაოდენობას. იგი ზრდის tau ცილების ჰიპერფოსფორილირებას და შესაბამისად იწვევს ცილოვანი აგრეგატების დაგროვებას ნეირონებში. ყოველივე ზემოაღნიშნულით სტრეპტოზოტოცინი იწვევს ალცჰაიმერის დაავადების ანალოგიურ მდგომარეობას, რაც ვლინდება მეხსიერების გამოხატული დარღვევებით და დასწავლის უნარის დაქვეითებით. ამ ეფექტის მისაღებად გამოიყენება ინტრაცერებროვენტრიკულური ინექციით (ICV) შეყვანილი სტრეპტოზოტოცინი, ლაბორატორიულ თავგებსა და ვირთავებში, დოზით 0.5-3მკგ/კგ. (ცხრილი 23)

§3.1.1.5 Aβ42 ზრდასრულ და ემრიონულ ზებრა თევზებში

Aβ42, ალფა სინუკლეინის აგრეგაციის გამომწვევი საკმაოდ ეფექტური საშუალებაა, რომელიც აქტიურად გამოიყენება თევზებში ალცჰაიმერის დაავადების მოდელირებისათვის. ამისათვის პირველ რიგში, ავზში ათავსებენ მდედრ და მამრ ზებრა თევზების ინდივიდებს, შეფარდებით 1:2. ისინი გამიჯნული არიან გამჭვირვალე ბარიერით მთელი ღამის განმავლობაში, დილის დადგომასთან ერთად ბარიერს ხსნიან. მოხსნიდან 15 წუთის შემდგომ ემბრიონები უნდა შეგროვდეს და გადაიტანოს სტერილურ უჯრედული კულტურის პლანშეტზე (20 ემბრიონი თითოეულ ფოსოში), რომელიც ინახება ინკუბატორში (28.5°C), 14:10 სინათლე/სიბნელე. 24 საათის შემდგომ ფოსოებში ემატება 10მკმოლ Aβ42, 5-10მკლ, გახსნილი 1% DMSO 0.5% Phenol Red, დამზადებული PBS-ზე (pH=7.0). შედეგები იკვეთება მეხუთე დღიდან. (ცხრილი 23)

§3.1.1.6 აკრილამიდი ზებრა თევზებში

აკრილამიდი (ACR) არის წყალში ხსნადი ალკენი, რომელიც ძირითადად გამოიყენება პოლიაკრილამიდების წარმოებაში. ექსპერიმენტული კვლევების უმეტესობა მიუთითებს, რომ ACR ექსპოზიცია იწვევს შერჩევით ნეიროტოქსიკურობას ადამიანებში. შექმნილია ცხოველთა სხვადასხვა მოდელი ACR-ის ნეიროტოქსიკურობაზე დაფუძნებით, მათ შორის: ვირთხებში, თავგებში, ზღვის გოჭებში, კურდღლებში, ძაღლებში, კატებში და პრიმატებში. ამ მოდელებს შორის განსაკუთრებით გამაოირჩევა თევზის ლარვის მოდელი. ამ მოდელისთვის დამახსიათებელია სარწმუნოების მაღალი ხარისხი და სიმარტივე. (ცხრილი 23)

ცხრილი 23. მეთოდოლოგიური მითითებები

ნეიროტოქსინი	ცხოველი	დოზა	შეყვანის ფორმა	ხანგრძლივობა
Al	ვირთაგვა	50მგ/კგ	Per Os	x3/კვირა, 90 დღე
AlCl ₃	ვირთაგვა	17მგ/კგ	Per Os	21 დღე
AlCl ₃	ვირთაგვა	300მგ/კგ	Per Os	60 დღე
სკოპოლამინი	ვირთაგვა	20მგ/კგ	I.P	8 დღე
სკოპოლამინი + შავი კვლიავის ზეთი	ვირთაგვა	1მგ/კგ + 1მგ/კგ	I.P + Per Os	14 დღე
სკოპოლამინი	თაგვი	1მგ/კგ	I.P	
სკოპოლამინი	ზებრათევზი	200 მკმოლ	წყალში	1 საათი
კოლხიციინით	ვირთაგვა	7.5მგ/2.5მკლ	ICV	
კოლხიციინით	ვირთაგვა	15მგ/5მკლ	ICV	
სტრეპროზოტოცინი	ვირთაგვა	0.5მგ/კგ	ICV	
სტრეპროზოტოცინი	ვირთაგვა	1მგ/კგ	ICV	
სტრეპროზოტოცინი	ვირთაგვა	3მგ/კგ	ICV	
სტრეპროზოტოცინი	თაგვი	3მგ/კგ	ICV	
Aβ42	ზებრათევზი	10მკმოლ	წყალში	
აკრილამიდი	ზებრათევზი	1მმოლ	წყალში	

§3.1.2 პარკინსონის დაავადება

პარკინსონის დაავადება (Parkinson's disease) ნეიროდეგენერაზიულ დაავადებებს შორის სიხშირით მეორე, პროგრესიულად მიმდინარეპათოლოგიაა, რომლის დროსაც უპირველესად მოტორული ფუნქციები ირღვევა. პარკინსონის დაავადების ძირითადი კლინიკური ნიშნებია: (1) ბრადიკინეზია; (2) მოსვენების ტრემორი; (3)რიგიდობა. როგორც ფაქტობრივად ყველა ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიისას, პარკინსონის დაავადების პროგრესირებისას შეიძლება განვითარდეს თანმდევი დემენცია. დაავადება პირველად 1817 წელს ინგლისელმა მეცნიერმა და ექიმმა, ჯეიმს პარკინსონმა (James Parkinson) აღწერა ცნობილ ნაშრომში „Essay on the Shaking Palsy“. მისი შესწავლა აქტიურად 1958 წლიდან, მას შემდეგ დაიწყო, რაც არვიდ კარლსონმა (Arvid Carlsson) დოფამინი ძუძუმწოვართა თავის ტვინში აღმოაჩინა. ნეიროდეგენერაციას პ.დ. -ის დროს სახასიათო ტოპოლოგია გააჩნია და განსხვავებით ჩვეულებრივი სიბერისაგან, ნეირონთა კვდომა არა მხოლოდ შავი სუბსტანციის კომპაქტური ნაწილის (SNpc) დორსო-მედიალურ, არამედ და უპირატესად ვენტროლატერალურ ნაწილში ხდება (Fearnley JM & Lees AJ, 1991). ცნობილია დოფამინერგულ ნეირონთა 4 ძირითადი გამტარი გზა: ნიგრო-სტრიატული, მეზოლიმბური, მეზოკორტიკალური და ტუბეროინფუნდიბულარული. პარკინსონის დაავადება სწორედ ნიგროსტრიატული გზის დოფამინური ნეირონთა დეგენერაციით ხასიათდება, იმ გზის, რომელშიც აღნიშნულ ნეიროტრანსმიტერს შემაკავებელი ფუნქცია აკისრია. ამდენად, რადგან სტრიატუმში ორი ტიპის (შავი სუბსტანციის დოფამინერგული შემაკავებელი და ქერქის გლუტამატური ნეირონების ამაგზნებელი) ურთიერთსაპირისპირო მოქმედების მოტორული იმპულსების რეგულირება ხდება: დოფამინერგულ ნეირონთა კვდომით გამოწვეული დოფამინის დეფიციტი იწვევს

ჭარბი აგზნების განვითარებას, რაც საფუძვლად უდევს ზემოხსენებული სიმპტომების პათოგენეზს. ბიოქიმიური თვალსაზრისით მასში, ცენტრალური როლი, ორ ძირითად პათოლოგიურ პროცესს: ლევის სხეულების წარმოქმნასა და უჯრედში ენერგეტიკურ უკმარისობას უჭირავს. საქმე ისაა, რომ ასაკობრივი თუ გენეტიკური ფაქტორები იწვევენ მიტოქონდრიათა დისფუნქციას, კერძოდ, სუნთქვის ჯაჭვის I კომპლექსის (NADH Dehydrogenase) ინჰიბირების სახით, რაც თავის მხრივ იწვევს ROS (reactive oxygen species) სუპეროქსიდების სინთეზის გაძლიერებას, და შესაბამისად ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას (Keeney PM et al., 2006; Dias V et al., 2013). ჟანგბადის აქტიური ფორმები (ROS) უჯრედის ნორმალური ცხოველქმედების დროსაც გვხვდება, თუმცა საგრძნობლად ნაკლები რაოდენობით. ამასგარდა, აღნიშნული სუპეროქსიდების გაუვნებელყოფას უზრუნველყოფს უჯრედის დამცველობითი სისტემები შაპერონებისა და პროტეასომების სახით (Aiken CT et al., 2011). მიჩნეულია, რომ შაპერონები მონაწილეობენ ცილების სტაბილიზაციაში (კომპლექსების წარმოქმნაში – ფოლდინგში), მაშინ როდესაც პროტეასომები გაუვნებელყოფენ და ანადგურებენ ოქსიდიზირებულ და არაფოლდირებულ ცილებს. ასაკისა და გარკვეული გენეტიკური ფაქტორების გამო, აღნიშნული სისტემები კარგავს ეფექტურობას, რაც ასევე აძლიერებს ნეიროტოქსიკურ ეფექტს და იწვევს უჯრედის პროგრამირებულ სიკვდილს ანუ აპოპტოზს. ოქსიდაციური სტრესის ტოქსიკურობა ემყარება გაძლიერებული ჟანგვითი პროცესების შედეგებს, მათ შორისაა უჯრედში კალციუმის იონთა სიჭარბე და ე.წ. tau ცილების ზეფოსფორილირება. ფოსფორილირებული tau ცილები, რომლებიც ნორმაში ციტოქონჩხის შემადგენელი ცილები გახლავთ, წარმოქმნიან აგრეგატებს (ზემოთ ხსენებულ ნეიროფიბრილურ გორგლაკებს), რომლებიც შემდგომ ფორმირებენ უჯრედშიდა პათოლოგიურ სტრუქტურებს – ლევის სხეულაკებს (Lewy body). თავისთავად ცილოვანი აგრეგატების ნეიროტოქსიკურობა ეჭვგარეშეა, რამეთუ ეს მოვლენა მრავალი სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიის დროს გვხვდება (ე.წ. ტაუპათიები, მათ შორის ალცჰაიმერის დემენციისას). ამავე ლევის სხეულაკების წარმოქმნაში ძირითად მონაწილეობას იღებს ცილა ალფა სინუკლეინი (alpha synuclein), რომლის აგრეგირებაც, მისი მაკოდირებელი გენის მუტაციითაა გამოწვეული. ალფა სინუკლეინი არის არაფოლდირებული ცილა, რომელიც უპირატესად ცენტრალური ნერვული სისტემის ნეირონთა პრესინაფსურ ტერმინალებში არის განთავსებული და ითვლება, რომ სინაფსურ გადაცემას უწყობს ხელს (Scott D & Roy S, 2012). ალფა სინუკლეინის აგრეგატები თანაარსებული ფოსფორილირებული ტაუ ცილების ნაწილაკებთან ქმნიან მძლავრ ტოქსიურ კონტინუუმს, რაც აქსონალურ გადაცემის შეფერხებას იწვევს. ყოველივე ზემოაღნიშნულისა და მიტოქონდრიათა დისფუნქციით გამოწვეული ATP -ის სინთეზის დარღვევით მიიღება დოფამინერგულ ნეირონთა დეგენერაციული სურათი, რომელიც პარკინსონის დაავადების ქვაკუთხედი (Lei P et al., 2010; Hu S et al., 2020). ლევი სხეულაკები როგორც ნეიროდეგენერაციის მორფოლოგიური ნიშანი ნანახია სხვა პათოლოგიების დროს (ლევი სხეულაკების დემენცია, მულსტისისტემური ატროფია და ა.შ.), რომლებიც შეიძლება გავავართიანოთ სინუკლეინოპათიების ქვეშ (Moussaud S et al., 2014; Koga S et al., 2021; Cabrero R & Morrison EH, 2025).

არსებობს პარკინსონის დაავადების მოდელირების მრავალი ქიმიო-ტოქსიკური მეთოდი, თუმცა მათგან განსაკუთრებულ აღნიშვნას საჭიროებს ოთხი მათგანი: 6-ჰიდროქსიდომანით; როტენონით; პარაქუატითა და MPTP -ით ინდუცირებული პარკინსონიზმი (Chia et al., 2020; Dauer & Przedborski, 2003; Kin et al., 2019; Morris et al., 2024; Vila, 2019).

§3.1.2.1 6-ჰიდროქსიდომანის მოდელი

აღსანიშნავია, რომ პარკინსონიზმის პირველი ცხოველური მოდელი, სწორედ 6-ჰიდროქსიდომანით (6-OHDA) იქნა ინდუცირებული. ეს მეთოდი საკმაოდ ეფექტურია, თუმცა მისი სირთულე მდგომარეობს 6-OHDA -ის ჰემატოენცეფალური ბარიერის გადალახვის უნარის არ არსებობაში, რის გამოც, აუცილებელია ტოქსინის შეყვანა უშუალოდ თავის ტვინის საჭირო სტრუქტურაში. ნეირონში მოხვედრის შემდგომ იგი სწრაფადვე იუანგება და წარმოქმნის ჟანგბადის აქტიურ ფორმებს (ROS), რომლებიც საბოლოო ჯამში იწვევს მიტოქონდრიულ დისფუნქციას. ხაზგასასმელია, რომ ამ დროს ჰისტოლოგიურად არ აღინიშნება ლევის სხეულები. პარკინსონის დაავადების ამ მოდელისათვის მისაღებ ობიექტად ითვლება მამრი თეთრი ლაბორატორიული ვირთავა, ან მამრი ლაბორატორიული თაგვი. ინექცია შესაძლოა იყოს, როგორც ცალმხრივი, ისე ორმხრივი, როგორც წესი ინტრასტრიატული. დოზები, ლიტერატურაში მერყეობს 1მკგ/მკლ/წთ/ინდივიდი -დან, 14მკგ/მკლ/წთ/ინდივიდი -მდე. საინექციო ხსნარი უნდა შეიცავდეს 0.01-0.02% ასკორბინის მჟავას, რათა მოხდეს 6-OHDA -ის In Vitro დაჟანგვის თავიდან არიდება. აღნიშნული მეთოდის შედეგად მიიღწევა შავი სუბსტანციისა და ზოლიანი სხეულის ნეირონებში დოფამინის რაოდენობის კლება, ოქსიდაციური სტრესის გაძლიერება და თიროზინ-ჰიდროქსილამას აქტივობის შემცირება. (ცხრილი 24).

§3.1.1.2 როტენონით ინდუცირებული მოდელი

როტენონი, ბუნებრივი, ორგანული ინსექტიციდია, რომელსაც გააჩნია უნარი დააზიანოს სუნთქვის ჯაჭვის პირველი კომპლექსი და გამოიწვიოს დოფამინერგული ნეირონების კვდომა. მისი ადმინისტრირების მეთოდები მრავალგვარია, კერძოდ შესაძლებელია ინტრაცერებრალური (შავ სუბსტანციაში; კანქვეშა ან ინტრაპერიტონეული ინექციის სახით. არსებობს მისი მიღების რამდენიმე ვარიანტი: 0.1მლ/კგ/24h (0.5მგ/მლ მზესუმზირის ზეთში), 35 დღის განმავლობაში, ინტრაპერიტონეულად; 21მლ/კგ/24h კონცენტრაციით (ქლოროფორმსა და კარბოქსიმეთილცელულოზას 0.5% ხსნარში), 20 დღე, კანქვეშ; 3მგ/კგ/24სთ (2% DMSO; 98% პოლიეთილგლიკოლი 400), 10 დღე, კანქვეშ; და ა.შ. როტენონ-ინდუცირებული მეთოდისათვის კვლევის ობიექტებად გამოიყენება მამრი ლაბორატო-რიული თეთრი ვირთაგვა. როტენონ-ინდუცირებული მოდელი მსგავსია ჭეშმარიტი პარკინსონის დაავადებისა, ამ დროს მიიღწევა ნეირონთა თანდათანობრივი კვდომა, დოფამინის რაოდენობის კლება და ალფა-სინუკლეინის რაოდენობის გაზრდა. ამავე მოდელს მიესადაგება ზებრა თევზებიც. (ცხრილი 24)

§3.1.1.3 პარაქუატით ინდუცირებული მოდელი

პარაქუატი ძალზედ ტოქსიკური, მეოთხეული ამოტური ჰერბიციდია, რაც მის ძირითად მინუსს მიეკუთვნება, ვინაიდან აღწერილია ინტოქსიკაციის მრავალი შემთხვევა. იგი გადალახავს ჰემატო-ენცეფალურ ბარიერს, იწვევს ოქსიდაციურ სტრესს, რაც საბოლოოდ დოფამინერგულ ნეირონთა კვდომის მიზეზი ხდება. მისი ადმინისტრირების ძირითადი ვარიაციებია: ინტრაპერიტონეულად, მამრ ლაბ. თავგებში 1-10მგ/კგ (სტერილურ ფიზ. ხსნარში), 2 -ჯერ კვირაში, 3 კვირის მანძილზე (ჯამური დოზა 6-60მგ/კგ); 1მგ/კგ/24h, 7 დღის მანძილზე, Per Os, მამრ ლაბ. ვირთაგვებში (ჯამური დოზა 7მგ/კგ). (ცხრილი 24)

§3.1.1.4 MPTP -ით ინდუცირებული მოდელი

1982 წელს ახალგაზრდა ნარკომომხმარებლებში გავრცელდა სწრაფად პროგრესირებადი პარკინსონიზმის სინდრომი. როგორც აღმოჩნდა, განვითარებული პათოლოგიური მდგომარეობა გამოწვეული იყო ე.წ. „ქუჩის“ ნარკოტიკული პრეპარატით – 1-მეთილ-4-ფენილ-4-პრო-პიონოქსიპირიდინით (MPPP), რომელიც ისეთი ნარკოტიკული ნივთიერების ანალოგი იყო, როგორიცაა მეპერიდინის (დემეროლი). შემოდგომმა ლაბორატორიულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ აღნიშნული სიმპტომატიკა MPPP -ის ნეიროტოქსიკური მინარევით: 1-მეთილ-4-ფენილ-1,2,3,6-ტეტრაჰიდროპირიდინით (MPTP) იყო გამოწვეული. სხვადასხვა ცხოველზე (მათ შორის ლაბორატორიული თაგვები, მაიმუნები და სხვა) ჩატარებულმა კვლევებმა დაადასტურა, რომ MPTP დოფამინერგულ გზებს პარკინსონის დაავადების ანალოგიური მექანიზმით აზიანებს, მათ შორის: SNpc -ში ნეირონთა დეგენერაცია მეტია, ვიდრე VTA-ში (Ventral tegmental area); თავად SNpc -ში დაზიანება უპირატესად ვენტრო-ლატერალურ სეგმენტებში ხდება; სახეზეა შავი სუბსტანციის სახასიათო დეპიგმენტიზაცია და ა.შ. თუმცა, არის გარკვეული სხვაობა მოცემულ მოდელსა და დაავადებას შორის – მოცემულ დაზიანებულ ქსოვილში არ ვხვდებით კლასიკურ ლევის სხეულებს (თუმცა აღწერილია მსგავსი შიდა ნეირონული ჩანარები), რაც დაკავშირებულია მოცემულ ნეირონთა დაზიანების სისწრაფესთან. საზოგადოდ, MPTP -ით ინიცირებული ნეიროდეგენერაციული მოდელი ლაბორატორიულ თაგვებში, მიიჩნევა პარკინსონის დაავადების შესწავლის ოქროს სტანდარტად. MPTP, სისტემური შეყვანის შემდგომ, რამდენიმე წუთში გადალახავს ჰემატოენცეფალურ ბარიერს, ვინაიდან იგი არა-პოლარული, ლიპოფილური მოლეკულაა. თავის ტვინში მოხვედრის შემდგომ იგი გლიურ უჯრედებში, ფერმენტ მონოამინოოქსიდაზა B -ს (MAO-B) საშუალებით იუნაგება 1-მეთილ-4-ფენილ-2,3-დიჰიდროპირიდინამდე (MPDP), რის შემდგომაც, იგი სპონტანური ჟანგვის გზით გარდაიქმნება 1-მეთილ-4-ფენილ-პირიდინად (MPP⁺), ეს უკანასკნელი იმის გათვალისწინებით, რომ პოლარული მოლეკულაა, ინტერსტიციალურ სივრცეში გამონთავისუფლების შემდგომ პლაზმური მემბრანის თავისუფლად გადალახვის უნარი არ გააჩნია. ზოგადად, პოლარულ მოლეკულებს, პლაზმური მემბრანის გადასალახად ესაჭიროებათ სპეციფიკური გადამტანი (ტრანსპორტერი). სკუთრივ MPP⁺, მაღალაფინური სუბსტრატია დოფამინის აქტიური ტრანსპორტერისათვის (dopamine active transporter / DAT) და ნაკლებად აფინურია ზოგიერთი სეროტონინისა და ნორეპინეფრინის გადამტანისთვის. სწორედ ამიტომ, MPP⁺ -ის შეყვანის შედეგად უპირატესად დოფამინერგული ნეირონები ზიანდება. ზემოთაღნიშნული გზით ნეირონში მოხვედრის შემდგომ, მისი ნეიროტოქსიურობა სამი ძირითადი მექანიზმით აიხსნება: (1) უკავშირდება მონოამინთა ვეზიკულურ ტრანსპორტერ 2 -ს (The Vesicular Monoamine Transporter / VMAT2), რომელიც MPP⁺-ის, დოფამინის ნაცვლად, სინაფსურ ვეზიკულებში გადაიტანს. (2) შესაძლოა მიტოქონდრიონებში კონცენტრირდეს ტრანსმემბრანული პოტენციალის ხარჯზე ან (3) დარჩეს ციტოპლაზმაში და დაუკავშირდეს უარყოფითი მუხტის მქონე ციტოპლაზმურ ფერმენტებს. მიუხედავად გზისა, MPP⁺ -ის ნეიროტოქსიკური მექანიზმი, ჟანგვითი ფოსფოლიპიდების გზით, I კომპლექსის (NAD დამოკიდებული

დეჰიდროგენაზა) ინჰიბირებით, მიტოქონდრიაში იონთა მიმოცვლის ჯაჭვის დარღვევაა. შედეგად, ეს იწვევს ATP -ის შემცირებას ქსოვილებში, უპირატესად კი ზოლიან სხეულსა და შუა ტვინის ვენტრალურ ნაწილში, რომლებიც ყველაზე მგრძნობიარენი არიან MPP⁺ -ისადმი. ამასთან, MPTP -ის შეყვანა, მსგავსად პარკინსონის დაავადებისა, იწვევს SNpc -ის დოფამინერგული ნეირონების ციტოზოლში ცილა სინუკლეინის დაგროვებას. მისი გამოყენება ხდება ინტრაპერიტონეული ან კანექცემა ინექციების სახით, დოზებით 10-30 მგ/კგ/4-ჯერ დღეში / 2სთ-იანი შუალედებით (ჯამური დოზა 40-120მგ/კგ. MPTP ასევე გამოიყენება ზებრა თევზის მოდელისთვისაც; ამისთვის ტოქსინი დოზით 5-10 მგ/მლ იხსნება წყალში, 3 დღის განმავლობაში ლარვებისთვის ასაკით 24სთ განაცოფიერებიდან. (ცხრილი 24)

ცხრილი 24. მეთოდოლოგიური მითითებები

ნეიროტოქსინი	გამხსნელი	ობიექტი	დოზა	შეყვანის ფორმა	ხანგრძლივობა
6-OHDA	0.2% ასკორბატი (0.9% NaCl-ზე)	ვირთავა	4მგ/მკლ/წთ	უნილატერალური ინექცია მარჯვენა სტრიატუმში	
6-OHDA	0.2% ასკორბატი (0.9% NaCl-ზე)	ვირთავა	5-15მგ/4მკლ	უნილატერალური ინექცია მარჯვენა სტრიატუმში	
6-OHDA	0.2% ასკორბატი (0.9% NaCl-ზე)	ვირთავა	20მგ/3მკლ	ბილატერალური ინექცია დორსო- ლატერალურ სტრიატუმში	
MPTP	0.9% NaCl	თავი	10მგ/კგ	I.P	3 დღე
MPTP	0.9% NaCl	თავი	30მგ/კგ	I.P	8 დღე
MPTP	0.9% NaCl	თავი	10-30მგ/კგ	I.P ან S.C	x4 / დღე
MPTP	---	ზებრა თევზი	5-10 მგ/მლ	წყალში	3-4 დღე
პარაქუატი	0.9% NaCl	თავი	1-10მგ/კგ	I.P	x2 დღეში , 3კვირა
პარაქუატი	სასმელი წყალი	ვირთავა	1მგ/კგ/დღეში	Per Os	7 დღე
როტენონი	---	ზებრა თევზი	1/10/100 მკმო ლ	წყალში	4 დღე
როტენონი	მზესუმზირის ზეთი	ვირთავა	0.5მგ/მლ; 1მლ/კგ/დღეში	I.P	35 დღე
როტენონი	მზესუმზირის ზეთი	ვირთავა	1.5-2.5მგ/კგ	S.C	5 კვირა
როტენონი	ქლოროფორმი/ კარბოქსიმეთილ- ცელულოზა.	ვირთავა	2მგ/კგ/დღეში	S.C	20 დღე
როტენონი	2% DMSO(პოლიეთილენ გლიკოლზე)	ვირთავა	3მგ/კგ/დღეში	S.C	10 დღე

§3.2 შიზოფრენია

შიზოფრენია, ენდოგენური, პროგრესიული ფსიქიკური დაავადებაა, რომელიც ხასიათდება ფსიქიკური ფუნქციების დისოციაციით, მიმდინარეობს ფსიქიკური დეფექტის აუცილებელი განვითარებით ემოციურ-ნებით სფეროში და სხვადასხვაგვარი პროდუქტიული (პოზიტიური) ფსიქოპათოლოგიური ცვლილებებით (მაგ. ბოდვა, ჰალუცინაცია, აფექტური აშლილობები, კატატონური სიმპტომები ა.შ.). მისთვის დამახასიათებელ სიმპტომებს, როგორც წესი, ყოფენ ოთხ ძირითად კატეგორიად: (1) პოზიტიური სიმპტომები, რომლებსაც მიეკუთვნება ჰალუცინაციები (უმეტესად მხედველობითი და სმენითი) და ბოდვა; (2) ნეგატიური სიმპტომები – ნორმალური ფსიქო-ემოციური რეაქციების დაქვეითება ან სრული დაკარგვა; კოგნიტური, რაც გულისხმობს მეხსიერებისა და ანალიტიკური უნარების დაქვეითებას. (3) დეზორგანიზებული სიმპტომები – აზროვნების პათოლოგიები და უნებლიე მოძრაობები. მიუხედავად იმისა, რომ შიზოფრენიის კონკრეტული მიზეზები და მექანიზმები უცნობია, ნანახია გარკვეული ბიოლოგიური საფუძვლები, რომელიც მოიცავს: თავის ტვინის სტრუქტურულ ცვლილებებს (მაგ. გაფართოებული პარაკუჭები, ქერქის გათხელება, წინა ჰიპოკამპის და ტვინის სხვა რეგიონების ზომის შემცირება); ცვლილებები ნეიროქიმიურ მდგომარეობაში, განსაკუთრებით შეცვლილია აქტივობა დოფამინისა და გლუტამატის გადაცემის მექანიზმში; ასევე, არსებობს მოსაზრება მისი გენეტიკური პრედისპოზიციის შესახებ. ნეიროტრანსმისიის ანომალიებმა საფუძველი ჩაუყარა შიზოფრენიის პათოფიზიოლოგიის თეორიებს. ამ თეორიების უმეტესობა ორიენტირებულია ნეიროტრანსმიტერების სიჭარბეს ან დეფიციტზე, მათ შორის დოფამინის, სეროტონინისა და გლუტამატის. შიზოფრენიის დროს დარღვეულია დოფამინის ოთხივე სასიგნალო გზა. მათ შორის, დარღვევები ნიგროსტრიატალური გამტარ გზაში იწვევს მოტორულ სიმპტომებს; მეზოლიმბური გზაში დოფამინის ჭარბი დონე, მიზეზია დადებით სიმპტომატიკის გამოხატვისა; მეზოკორტიკალური გზის დარღვევა, შიზოფრენიის ნეგატიური სიმპტომებისა და კოგნიტური დეფიციტის გამომწვევია; ხოლო ტუბეროინფონდიბულური გზაში დოფამინის შემცირება იწვევს პროლაქტინის დონის ამაღლებას და შედეგად, გალაქტორეას, ამენორეასა და ლიბიდოს დაქვეითებას. აღნიშნულს ამყარებს ის ფაქტიც, რომ შიზოფრენიის სამკურნალოდ გამოყენებადი, ანტიფსიქოზური პრეპარატები ძირითადად ორიენტირებულია დოფამინერგული რეცეპტორების ინჰიბირებაზე. ამასთან, საკულისხმოა, რომ არსებობს შიზოფრენიის განვითარების ე.წ. სეროტონინის ჰიპოთეზა, რომელიც გაჩნდა მას შემდეგ, რაც აღმოჩნდა, რომ ლიბერგინის მჟავას დიეთილამიდი (LSD) აძლიერებდა სეროტონინის მოქმედებას ტვინში და დადებითად მოქმედებდა შიზოფრენიის მიმდინარეობაზე. დამატებითი კვლევების ჩატარების შემდგომ შემუშავდა ისეთი ფარმაკოლოგიური ნაერთები, რომლებიც ბლოკავენ, როგორც დოფამინის, ასევე სეროტონინის 5-HT რეცეპტორებს და საკმაოდ ეფექტურად გამოიყენება შიზოფრენიის, როგორც დადებითი, ასევე უარყოფითი სიმპტომების შესამსუბუქებლად. შიზოფრენიის სიმპტომების მიზეზების შესახებ კიდევ ერთი თეორია მოიცავს გლუტამატის, თავის ტვინის მთავარი ამაგზნებელი ნეიროტრანსმიტერის აქტივობის დაქვეითებას. ეს თეორია წარმოიშვა იმის საპასუხოდ, რომ კვლევებმა აჩვენა გლუტამატური NMDA რეცეპტორთა არაკონკურენტული ანტაგონისტების (რომლებსაც მიეკუთვნებიან მაგ. ფენილციკლიდინი და კეტამინი) პოტენციალი გამოიწვიონ შიზოფრენიის მსგავსი სიმპტომები. ეს თავისმხრივ, გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ NMDA რეცეპტორების აქტივობა დაქვეითებულია შიზოფრენიის დროს.

შიზოფრენიის ერთიანი, დაავადების ანალოგიური ცხოველური მოდელი პრაქტიკულად არ არსებობს. ამიტომ, ტრანსლაციის პრინციპის შერჩევა ხდება იმის მიხედვით, თუ რა სისტემის შესწავლას გეგმავს მკვლევარი. არსებობს ასეთი რამდენიმე გავრცელებული მეთოდი, კერძოდ: პოზიტიური სიმპტო-მატიკის მაინდუცირებელი, დაფუძნებული დოფამინერგულ ჰიპერფუნქციაზე; მოდელი დაფუძნებული გლუტამატურ ჰიპოფუნქციაზე; ნეგატიური სიმპტომატიკის მაინდუცირებელი, დაფუძნებული დოფამინერგულ ჰიპოფუნქციაზე და სეროტონინერგული მოდელი. ასევე არსებობს სხვა ნეიროტოქსიკური მოდელებიც, თუმცა ჩვენ მათზე არ შევჩერდებით (Bialon et al., 2022; Jones et al., 2011; Lee & Zhou, 2019; Malik et al., 2023; Petty et al., 2021; Uliana et al., 2022; Wang et al., 2021; Winship et al., 2019).

§3.2.1 ამფეტამინით ინდუცირებული მოდელი

მოგესხნებათ რა დოფამინერგული ჰიპერფუნქცია წარმოადგენს მიზეზს ე.წ. პოზიტიური სიმპტომატიკისა, მისი მოდელირებისათვის ფართოდ გამოიყენება ისეთი ნარკოტიკული საშუალებები, რომლებიც ან ზრდიან დოფამინის პრესინაფსური ნეირონიდან გამონთავისუფლების ხარისხს, ან აფერხებენ მისი უკუმიტაცების პროცესს, მაგ. ტრანსპორტერის (DAT) ინჰიბირების გზით. ასეთ ნივთიერებათა შორის, ყველაზე ხშირად გამოიყენება წარმოადგენს ამფეტამინი (Amphetamine). ამფეტამინის ტრანსლაციური მოდელები მრავალია, მათ შორის საკმაოდ გავრცელებულია თეთრ ლაბორატორიულ ვირთაგვებზე 0.5-1.5მგ/კგ დოზით, 21-5 დღის განმავლობაში ზემოქმედებით მიღებული ვარიანტი (ცხრილი 25).

§3.2.2 NMDA რეცეპტორების ანტაგონისტებით ინდუცირებული მოდელი

გამომდინარე იქიდან, რომ შიზოფრენიის დროს ჩამოყალიბებული კოგნიტური დარღვევები ყველაზე უკეთ სწორედ გლუტამატური თეორიით აიხსნება, მისი მოდელირებისათვის ფართოდ გამოიყენება გლუტამატურ NMDA რეცეპტორების ანტაგონისტი ნივთიერებები, როგორებიცაა კეტამინი (Ketamine / 2-chlorophenyl-2-methylamino-cyclohexanone) და ფენციკლიდინი (Phencyclidine / PCP) და MK-801 (Dizocilpine). ისინი საკმაოდ ეფექტურად ახდენენ ისეთი სახასიათო სიმპტომების ტრანსლირებას, როგორებიცაა ჰალუცინაციები, დელირიუმი, კონფუზიები, აჟიტაცია და სხვა. ზემოთქმული ეფექტების მისაღწევად თეთრ ლაბორატორიულ ვირთაგვებში იყენებენ კეტამინს დოზით 25მგ/კგ, I.P; MK-801-ს დოზით 0.1-0.5მგ/კგ, I.P; PCP-ს დოზით 2-5მგ/კგ, I.P. ასევე danio rerio-ს ზრდასრულ ინდივიდებს გამოეხატებათ მგრძნობელობა MK-801 -სადმი და ავლენენ შიზოფრენიის მაგვარ ქცევას. ამისათვის ზრდასრული ინდივიდები 15 წუთის განმავლობაში თავსდებიან 300მლ-იან რეზერვუარში ინდივიდუალურად, რომელიც შეიცავს აკვარიუმის წყალში გახსნილ ტოქსინს (5 მკმოლ). (ცხრილი 25)

§3.2.3 ნეგატიური სიმპტომატიკის მაინდუცირებული მოდელი

შიზოფრენიისათვის სახასიათო ნეგატიური სიმპტომატიკის ინდუცირებისათვის, მოლეკულურ ფსიქიატრიაში უპირატესად იყენებენ 6-OHDA მოდელს. აღნიშნული ნივთიერება, ჩვენ უკვე ვახსენეთ პარკინსონის დაავადების განხილვისას (იხ. გვ.17). აღნიშნული ტოქსინით ხდება გაწოლილი ბირთვის (nucleus accumbens) დაზიანება, რაც იწვევს მასში დოფამინერგულ დეფიციტს და შესაბამის სიმპტომატიკას. (ცხრილი 25)

§3.2.4 სეროტონინერგული მოდელი

სეროტონინი ერთ-ერთი ის მონოამინური ნეიროტრანსმიტერია, რომელსაც მეცნიერები უკავშირებენ შიზოფრენიის პათოფიზიოლოგიას. ნანახია, რომ სეროტონინერგული 5-HT_{2A/2C} რეცეპტორების აგონისტი ნაერთი 2,5-დიმეთოქსი-4-იოდოამფეტამინით (ასევე ცნობილი, როგორც DOI) ლაბ. თეთრ თაგვებზე ზემოქმედება, იწვევს შიზოფრენიის მაგვარ მდგომარეობას. დოზები, ლიტერატურაში, მერყეობს 1 - 2.5მგ/კგ -მდე. (ცხრილი 25)

ცხრილი 25. მეთოდოლოგიური მითითებები

ნეიროტოქსინი	ცხოველი	დოზა	შეყვანის ფორმა	ხანგრძლივობა
კეტამინი	ვირთაგვა	2.5მგ/კგ	I.P	
ფენციკლიდინი	ვირთაგვა	2.5მგ/კგ	I.P	
MK-801	ვირთაგვა	0.1მგ/კგ	I.P	
MK-801	ზებრაფიშები	5მკმოლ/300მლ	წყალში	15წთ
DOI	თაგვი	2.5მგ/კგ	I.P	x2/ 48სთ-იანი შუალედით
DOI	თაგვი	2.5მგ/კგ	I.P	x1/დღეში, 13 დღე
DOI	თაგვი	1მგ/კგ	I.P	x1/დღეში, 8 დღე.

ფ3.3 ბიპოლარული აშლილობა

ბიპოლარული აშლილობა (BD) არის ენდოგენური ბუნების, ქრონიკული ფსიქიკური აშლილობა, რომელსაც ახასიათებს განწყობის უკიდურესი ცვალებადობა, რომელიც წარმოდგენილია მანიისა და დეპრესიის ეპიზოდებით. ორივე მათგანს ახასიათებს სამი ძირითადი სიმპტომის ერთობლიობა ანუ ე.წ. ტრიადა. მანიაკალური ტრიადა მოიცავს: ჰიპერთიმია (უზაროდ აწეული გუნებ-განწყობა), ჰიპერაქტიურობა და ტაქიფსიქია (ასოციაციური პროცესის აჩქარება). ამ ეპიზოდების დროს ინდივიდებს შეუძლიათ განიცადონ ენერგიის მომატება, ეიფორია, გაღიზიანება და ძილის მოთხოვნის შემცირება. ამის საპირისპიროდ, დეპრესიული ეპიზოდები ხასიათდება დაწეული გუნებ-განწყობით ანუ ჰიპოთიმით, ჰიპოაქტიურობითა და ბრადიფსიქიით ანუ დაწეული გუნებ-განწყობით. ასევე როგორც წესი მას თან ახლავს, სევდის, უიმედობის გრძნობა და ანჰედონია ანუ სიამოვნების განცდის უნარის ნაკლებობა. აშლილობის ეტიოლოგია მულტიფაქტორულია, რომელიც მოიცავს გენეტიკურ, ნეირობიოლოგიურ და გარემო ფაქტორებს. ნეიროტრანსმიტერების, განსაკუთრებით დოფამინის, სეროტონინისა და ნორეპინეფრინის მოქმედების დისრეგულაცია BD-ის პათოფიზიოლოგიის ძირითადი ასპექტია. BD-ს შესასწავლად შემუშავდა ცხოველთა სხვადასხვა მოდელები, რომლებიც ასახავს აშლილობის მანიაკალურ და დეპრესიულ ფაზებს. ერთ-ერთი ძირითადი მოდელი გულისხმობს მღრღნელების ფსიქოსტიმულატორების მიმართ ქცევით სენსიბილიზაციას. მაგალითად, ნარკოტიკების განმეორებით მიღებამ, როგორიცაა კოკაინი, ამფეტამინი, ლიზდექსამფეტამინ დიმეზილატი, ფენილპროპონი, ალფა-ლიპოის მჟავა და GBR12909 შეიძლება გამოიწვიოს მღრღნელებში ჰიპერაქტიურობა და მანიის მსგავსი ქცევა. ეს მოდელები ეფუძნება იმეორებენ BD-ის მანიაკალურ ფაზებს, რაც მკვლევარებს საშუალებას აძლევს შეისწავლონ მანიის საფუძვლად არსებული ნეირობიოლოგიური მექანიზმები და გამოსცადონ პოტენციური მკურნალობა. მეორეს მხრივ, ამ ფსიქოსტიმულანტებისგან თავის დაღწევა ხშირად იწვევს დეპრესიის მსგავს ქცევებს, რაც უზრუნველყოფს BD-ის ორივე ფაზის შესწავლის ყოვლისმომცველ მოდელს. არსებობს მოდელები, რომლებიც ფოკუსირებულია ქოლინერგულ სისტემაზე, სადაც ხდება მანიპულირება ისეთი აგენტებით, როგორიცაა არეკოლინი და ფიზოსტიგმინი, რომლებიც იწვევენ დეპრესიის მსგავს სიმპტომებს. ეს მიდგომა ამყარებს დეპრესიული ეპიზოდების დროს ქოლინერგული დისბალანსის ჰიპოთეზას. კატექოლამინერგული სისტემის მოდელები, რომლებიც მოიცავს ამფეტამინების და სხვა კატექოლამინის ამაღლებული მედიკამენტების მიღებას, იმეორებს მანიის მსგავს მდგომარეობას, სინაფსური დოფამინისა და ნორეპინეფრინის დონის გაზრდით. ეს მოდელები ხაზს უსვამს კატექოლამინების როლს BD-ში და იძლევა განწყობის სტაბილიზატორების გამოკვლევის საშუალებას, როგორიცაა ლითიუმი და ვალპროატი, რომლებმაც აჩვენეს ეფექტურობა მანიაკალური და დეპრესიული ქცევების შესუსტებაში ამ ცხოველთა მოდელებში (Beyer & Freund, 2017; Freund & Juckel, 2019; Mack et al., 2019). უფრო დეტალურად ზოგიერთი პრეპარატის გამოყენების პრინციპები წარმოდგენილია ქვევით, ცხრილი 26-ში.

ცხრილი 26. მეთოდოლოგიური მითითებები

ნეიროტოქსინი	ცხოველი	დოზა	შეყვანის ფორმა	ხანგრძლივობა
კოკაინი	ვირთავა	15მგ/კგ	I.P	x1, 14დღე
ამფეტამინი	ვირთავა	2მგ/კგ	I.P	x1, 7დღე
ლიზდექსამფეტამინ დიმეზილატი	ვირთავა	3-10მგ/კგ	Per Os	x1, 7დღე
ალფა-ლიპოის მჟავა	თაგვი	50მგ/კგ	I.P	x1, 7დღე
GBR12909	თაგვი	10მგ/კგ	I.P	x1, 7დღე
ძილის დარღვევა	ვირთავა/თაგვი	---	---	24-72სთ

§3.4 დეპრესია

დეპრესია რთული კლინიკური ფენომენია, რომელიც დაკავშირებულია, როგორც ნეიროქიმიურ ცვლილებებთან, ისე მასტრესირებელ გარემოსა და ფსიქო-ემოციურ ფაქტორებზე. დეპრესიას, რომელიც დაკავშირებულია ნეიროქიმიურ ცვლილებებთან, ასევე უწოდებენ ძირითად დეპრესიულ აშლილობას (MDD) ან კლინიკურ დეპრესიას. ამ აშლილობის მქონე პირებს უჭირთ ყოველდღიური აქტივობების შესრულება, არასტაბილური ემოციური მდგომარეობის გამო მიდრეკილნი არიან სუიციდისაკენ და ქრონიკულად განიცდიან ანჭედონიას. დეპრესიის სახასიათო სიმპტომებს მიეკუთვნება: სევდა; სიცარიელის ან უიმედობის გრძნობა; ინტერესის ან სიამოვნების დაკარგვა ზოგიერთი ან ყველა ნორმალური აქტივობის მიმართ; ძილის დარღვევა; მუდმივი დაღლილობა და ენერგიის ნაკლებობა; მადის დაქვეითება და წონის დაკლება ან გაზრდილი მოთხოვნილება საკვების მიმართ და წონის მომატება; შფოთვა ან აგზნებადობა; შენელებული აზროვნება; დანაშაულის გრძნობა და ა.შ. დეპრესიის ეტიოლოგია ბუნდოვანია, სავარაუდოა მონოამინთა ნორმალური ფუნქციონირების დარღვევა. ასევე ყურადსაღებია რიგი მასტრესირებელი გარემოფაქტორები, რომლებსაც აქვთ პოტენციური გამოიწვიონ დეპრესიული მდგომარეობა. მიუხედავად იმისა, რომ დეპრესიის მოლეკულური მექანიზმები, ჯერაც ბუნდოვანია, თანამედროვე მეცნიერება გვთავაზობს რამდენიმე მნიშვნელოვან თეორიას, რომლებიც რიგ სამეცნიერო და კლინიკურ კვლევებს ეფუძნება. ასე, ნანახია, რომ დეპრესიის დროს დარღვეულია რამდენიმე მოლეკულური სისტემა, მათ შორის საკვანძო და ძირითადია: (1) მონოამინები; (2) გამა-ამინოერბოსმუავა (GABA); (3) გლუტამატი; (4) კორტიკოტროპინ-რელიზინგ-ჰორმონი (CRH) და არგინინ-ვაზოპრესინი (AVP); (5) ტვინის ნეიროტროფული ფაქტორი (BDNF); ამასგარდა, არსებობს ცნობები, რომ დეპრესიის გამომწვევ ფაქტორებს მიეკუთვნება ჟანგბადისა და აზოტის აქტიური ფორმების (ROS და RNS) დაგროვებით გამოწვეული ოქსიდაციური სტრესი. ამდენად აღნიშნული აშლილობის მაინიცირებელი შესაძლოა გახდეს ანტიოქსიდანტური ფუნქციის მატარებელი ისეთი მოლეკულების დეფიციტი, როგორებიცაა: C ვიტამინი, ცინკი და კოენზიმი Q10. ოქსიდაციურ სტრესთანაა დაკავშირებული დეპრესიის განმაპირობებელი კიდევ ერთი მექანიზმი - აუტოიმუნური სისტემების აქტივაცია.

მონოამინერგული სისტემები ჩართულია ტვინის ფუნქციების ფართო სპექტრის, მათ შორის განწყობის, ყურადღების, ძილისა და მადის რეგულირებაში. ნანახია, რომ ფერმენტ მონოამინოქსიდაზას (MAO) ინჰიბირება იწვევს მონოამინების კონცენტრაციის გაზრდას პრესინაფსურ ნეირონებში, და ამასთან გააჩნია ანტიდეპრესანტული ეფექტი. ამ დაკვირვებამ განაპირობა დეპრესიის მოლეკულური მექანიზმის ყველაზე რელევანტური თეორია, რომელსაც მონოამინთა დეფიციტის ჰიპოთეზასაც უწოდებენ. ეს თეორია ამტკიცებს, რომ დეპრესიის ძირითადი პათოფიზიოლოგიური საფუძველი არის ნეიროტრანსმიტერების სეროტონინის, ნორეპინეფრინის ან/და დოფამინის დაქვეითება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. 5-ჰიდროქსიტრიფტამინი, ანუ სეროტონინი არის ყველაზე ფართოდ შესწავლილი ნეიროტრანსმიტერი დეპრესიის პათოგენეზში. ცენტრალური სეროტონინერგული სისტემის პათოლოგიურად დაქვეითებული ფუნქციის ყველაზე პირდაპირი მტკიცებულება მომდინარეობს ტრიპტოფანის დეპლეციის გამოყენებით ჩატარებულ კვლევებში, რაც ამცირებდა სეროტონინის სინთეზს, ასეთი შემცირება კი იწვევს დეპრესიული სიმპტომების განვითარებას. ექსპერიმენტულად შემცირებული ცენტრალური სეროტონინი ასოცირდება განწყობის თანმიმდევრული მესხიერებისა და ჯილდოსთან დაკავშირებული ქცევების შეცვლასთან (reward-related behaviors). თავის ტვინის სპეციფიკური ფერმენტის, ტრიპტოფან 3-ჰიდროქსილაზა-2-ის მაკოდირებელი გენის მუტაცია იწვევს სეროტონინის რაოდენობის შემცირებას. დადგენილია, რომ ცენტრალური ნორადრენერგული სისტემის დისფუნქცია თამაშობს მნიშვნელოვან როლს MDD -ს პათოფიზიოლოგიაში. აღნიშნული მოსაზრება დაფუძნებულია ნორეპინეფრინის მეტაბოლიზმის დაქვეითების, თიროზინ-3-ჰიდროქსილაზას გაზრდილი აქტივობის და ნორეპინეფრინის გადამტანის სიმკვრივის შემცირებასთან locus coeruleus -ში დეპრესიულ პაციენტებში. გარდა ამისა, ნეირონების რაოდენობის დაქვეითება აღნიშნულ სტრუქტურაში, გაზრდილი ალფა2 და ალფა1 ადრენერგული რეცეპტორების რაოდენობის დაქვეითება იქნა აღმოჩენილი დეპრესიული სუიციდის მსხვერპლთა ტვინში, სიკვდილის შემდგომ. იმის გამო, რომ არ არსებობს ცენტრალური ნორეპინეფრინის შერჩევითი დაქვეითების მეთოდი და ცენტრალური ნორეპინეფრინის სისტემის შესასწავლი ვიზუალიზაციის ინსტრუმენტი, დეპრესიაში ამ სისტემის პათოლოგიის მყარი მტკიცებულება არ არსებობს. დეპრესია და ანჭედონია დაკავშირებულია ჯილდოსთან დაკავშირებული ქცევების შეცვლასთან (reward-related behaviors). დეპრესიისას შემცირებულია დოფამინის მემბრანული ტრანსპორტერის (DAT) რაოდენობაც, რაც განაპირობებს ნეიროტრანსმიტერის კონცენტრაციის შემცირებას. ასევე შემცირებულია D_2 / D_3 რეცეპტორების რაოდენობა ზოლიან სხეულსა და ამიგდალას ცენტრალურ და ბაზალურ ბირთვებში. მაგნიტურ-რეზონანსული სპექტროსკოპიის კვლევების სერიამ აჩვენა გამა-ამინოერბოს მუავას (GABA) კონცენტრაციის შემცირება პრეფრონტალურ და კეფის ქერქში MDD -ს დროს. ეს შეიძლება ასახავდეს მწვავე სტრესის ეფექტებს, ვინაიდან ფსიქოლოგიური სტრესი, როგორც ჩანს, იწვევს პრეფრონტალური GABA -ს ნეიროტრანსმისის პრესინაფსურ დაქვეითებას. ალტერნატიულად, დაბალი საერთო GABA კონცენტრაცია შეიძლება ასახავდეს GABA-ერგულ

ინტერნეირონთა ზომის შემცირებასაც. გარდა ამისა, ქრონიკულმა სტრესმა შეიძლება დააქვეითოს GABA-A რეცეპტორის ფუნქცია. გარკვეული კვლევებით მოპოვებული მტკიცებულებები მიუთითებს გლუტამატის ნეიროტრანსმიტერული სისტემის დისფუნქციაზე MDD -სას. მოგესხენებათ, გლუტამატი, ცენტრალური ნერვული სისტემის მთავარი ამაგზნებელი ნეიროტრანსმიტერია. ნანახია, რომ დეპრესიის დროს მისი რაოდენობა იზრდება 24სთ -ის განმავლობაში და შემდეგი 4 კვირის მანძილზე მცირდება, ასევე მცირდება მისი სინაფსური ტრანსპორტერის, VGLUT 1 -ის რაოდენობა ჰიპოკამპის CA1 უბანში.

გარდა მონოამინდოფინიტური თეორიისა, არსებობს მოსაზრებები დეპრესიის პათოგენეზში სხვა მოლეკულების აქტიური ჩართულობის შესახებ. კერძოდ, არსებობს კონვერგენტული მტკიცებულება იმისა, რომ კორტიკოსტერონ რილიზინგ ჰორმონი (CRH) თამაშობს მნიშვნელოვან როლს გარკვეული ტიპის დეპრესიის პათოგენეზში. CRH გამოიყოფა ჰიპოთალამუსიდან, სტრესის აღქმის საპასუხოდ. ეს ჰორმონი იწვევს ჰიპოფიზიდან კორტიკოტროპინის სეკრეციას, რომელიც ასტიმულირებს თირკმელზედა ჯირკვლიდან კორტიზოლის პლაზმაში გამოყოფას. CRH -ის დონე ცერებროსპინალურ სითხეში მომატებულია ზოგიერთ დეპრესიულ სუბიექტში. სიკვდილის შემდგომმა კვლევებმა აჩვენა CRH -ის სეკრეტორული ნეირონების გაზრდილი რაოდენობა დეპრესიის დროს ტვინის ლიმბურ რეგიონებში, რაც სავარაუდოდ ასახავს კომპენსატორულ პასუხს CRH კონცენტრაციის გაზრდაზე. გარდა ამისა, CRH იწვევს უამრავ ფიზიოლოგიურ და ქცევით ცვლილებას, რომლებიც ჰგავს დეპრესიის სიმპტომებს, მათ შორის მადის დაქვეითებას, ძილის დარღვევას, ლიბიდოს დაქვეითებას და ფსიქომოტორულ ცვლილებებს. აღსანიშნავია იმუნური სისტემის როლიც, სახელობრ, ანთებითი პასუხის სისტემის გააქტიურების შედეგად განვითარებული ქცევა, ერთობ მსგავსია დეპრესიის ბევრი სიმპტომსა, მათ შორისაა: დაღლილობა, ანჰედონია, ფსიქომოტორული ჩამორჩენა და კოგნიტური დაქვეითება. აღნიშნულს შუამავლობს ანთების საწინააღმდეგო ციტოკინები, როგორიცაა ინტერლეიკინ 1α, სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი-α და ინტერლეიკინ-6, რომლებიც ააქტიურებენ ჰიპოთალამუს-ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის სისტემას (HPA) და აზიანებენ სეროტონინერგულ სისტემას. ამას ამტკიცებს ისიც, რომ ცხოველებში, ციტოკინის გაშუალეუებული ანთების სიგნალის ბლოკირებას ანტიდეპრესანტების მსგავსი ეფექტები აქვს.

რაც შეეხება შიზოფრენიის ტრანსლაციას ცხოველებზე, ცხადია ეს მეთოდები ეფუძნება ზემოთქმულ ბიოქიმიურ და პათოფიზიოლოგიურ პრინციპებს. მის მოდელირებაში გამოიყენება სამი ძირითადი მოდელი, კერძოდ: (1) ადრეული ასაკის სტრესის; (2) ზრდასრული ასაკის სტრესისა და (3) ქიმიურად ინდუცირებული მოდელები (Ahmari & Dougherty, 2015; Czéh et al., 2016; Hao et al., 2019; Harro, 2019; Planchet et al., 2019; Qiu et al., 2020; Uliana et al., 2022; Yankelevitch-Yahav et al., 2015).

§3.4.1 ადრეული ასაკის სტრესის მოდელი (ELSM)

აღნიშნული მოდელი გულისხმობს ორ ძირითად მეთოდს: პირველი მათგანი ეფუძნება პერინატალურ სტრესს, გამოწვეულს დედისა და ნაშიერების ხანგრძლივი ან ხანმოკლე დაშორებით. კვლევებით ნაჩვენებია, რომ დაბადებიდან 2-3 კვირით დაშორება იწვევს დეპრესიულ ცვლილებებს მშობელში, ხოლო ეპიზოდური დაშორება 3-4 სთ დღეში, მეტად მოქმედებს შთამომავლობაზე, რომელიც შედეგად ავლენს შფოთვით და დეპრესიულ ცვლილებებს. მეორე მათგანი კი გულისხმობს პერინატალურ პერიოდში, სხვადასხვა გამლიზიანებლების საშუალებით ზემოქმედებას. ამისათვის შესაძლოა გამოყენებულ იქნას სხვადასხვა სიხშირითა და სიძლიერით მხედველობითი (შუქი) და სმენითი (ხმაური) გამლიზიანებლები, ან საკმაოდ ფართოდ გავრცელებული წყლით შოკი (მაკე ვირთაგვა ყოველდღიურად თავსდება ცივ წყალში, 15 წუთის განმავლობაში. (ცხრილი 27)

§3.4.2 ზრდასრული ასაკის ცხოველების სტრესის მოდელი

იმისათვის, რომ ზრდასრულ ლაბორატორიულ ცხოველებში გამოიწვიონ დეპრესია, მიმართავენ ორ ძირითად მეთოდს: (1) ქრონიკულ სტრესს (მაგ. სოციალური იზოლაცია; არაპროგნოზირებადი, ქრონიკული, მსუბუქი სტრესი და სხვა) და (2) უძღურების დასწავლას. (ცხრილი 27)

არაპროგნოზირებადი ქრონიკული მსუბუქი სტრესი (USMS). დეპრესიის ქრონიკული სტრესით ინდუცირების მეთოდებს შორის ყველაზე გავრცელებული და შედარებით ეფექტური, არაპროგნოზირებადი ქრონიკული მსუბუქი სტრესია, ასევე ცნობილი როგორც USMS (ინგლ. Unpredictable Chronic Mild Stress). აღნიშნული მეთოდი გულისხმობს სხვადასხვა სტრეს ფაქტორით (ელექტროშოკი; ყინულზე სიარული; ფიქსაცია; ცივი წყლის აბაზანა; კუდის მოკვეთა; წყლისა და საკვების შეზღუდვა; ცირკადული რიტმის დარღვევა და სხვა) არაპროგნოზირებადად, ყოველგვარი სისტემატიზაციის გარეშე მოქმედებას ყოველდღიურად 3-4 კვირის განმავლობაში. მიუხედავად იმისა, რომ ეს მეთოდიც, ისევე როგორც დეპრესიის ინდუქციის ყველა სხვა სტრესზე დაფუძნებული მეთოდი საკმაოდ არასტაბილურია, თუმცა მაინც ყველაზე სარწმუნოდ ითვლება ამ ტიპის მეთოდებს შორის.

ვინაიდან ნანახია, როგორც ქცევითი ისე ნეიროქიმიური ცვლილებები, ამასთან სხვადასხვა ანტიდეპრესანტის (მაგ. იმიპრამინი; მოკლობემიდი; ფლუოქსეტინი და სხვა) ეფექტურობა.

უძლურების დასწავლის მეთოდი (Learned Helplessness Model (LHM)). უძლურების დასწავლის მეთოდი ერთ-ერთი გავრცელებულია დეპრესიის ტრანსლირებისას. იგი გულისხმობს ლაბორატორიული ცხოველების რანდომიზირებულ, არაპროგნოზირებად სტრესორებს ელექტროშოკის საშუალებით (კუდის, თათების ან სხვა), 3-7 დღის განმავლობაში. აღნიშნული პროცედურის შედეგად ცხოველებს უვითარდებათ უძლურების განცდა, ანჰედონია და დეპრესიის სხვა ნიშნები. მიუხედავად იმისა, რომ აღწერილია Learned Helplessness მოდელის შედეგად განვითარებული ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური ცვლილებები, არასტაბილურობის გამო არც ეს მიდგომა ითვლება ოქროს სტანდარტად.

§3.4.3 ქიმიურად ინდუცირებული მოდელი

დეპრესიის, ისევე, როგორც უმეტესობა სომატური თუ ფსიქიკური პათოლოგიის ტრანსლირების ყველაზე ეფექტურ საშუალებებს მიეკუთვნებიან ქიმიურად ინდუცირებული მოდელები. მათ შორის განიხილება: რემერპინით (RES) და კორტიკოსტერონით (CORT) ინდუცირებული ვარიანტები. რემერპინ-ინდუცირებული მოდელის განხორციელება შესაძლებელია, როგორც ვირთაგვებზე, ისე თაგვებზე, ინტრაპერიტონეული ინექციების სახით 0.2-0.5მგ/კგ დოზით. რაც შეეხება კორტიკოსტერონს, მისი გამოყენებაც შესაძლებელია ორივე ხსენებულ ლაბორატორიულ მღრღნელზე, დოზები კი მერყეობს 5-40მგ/კგ ფარგლებში. (ცხრილი 27)

ცხრილი 27. მეთოდოლოგიური მითითებები

მეთოდი	გამსენელი	ცხოველი	დოზა	შეყვანის ფორმა	ხანგრძლივობა
რემერპინი	PBS	თაგვი	0.5მგ/კგ/დღე (100მკლ)	I.P	10 დღე
რემერპინი	ყინ.ძმარმუავა (1მკგ/მკლ) + 25მლ წყალი	ვირთაგვა	0.2მგ/კგ/დღე	I.P	15 დღე
კორტიკოსტერონი	NaCl (0.9%)	თაგვი	40მგ/კგ/დღე	I.P	21 დღე
კორტიკოსტერონი	NaCl (0.9%)	ვირთაგვა	20მგ/კგ/დღე	I.P	7-35 დღე
კორტიკოსტერონი	beta-Cyclodextrin (4.5მგ/მლ)	თაგვი	35მკგ/მლ სასმელ წყალში (5მგ/კგ/დღე)	Per Os	28 დღე
ELSM	მაკე ვირთაგვა, ყოველდღიურად თავსდება ცივ წყალში 15 წუთის განმავლობაში				
USMS	ვირთაგვაზე ან თაგვზე ხდება არაპროგნოზირებადი ზემოქმედება სხვადასხვა სახის სტრეს-ფაქტორით, 3-4 კვირის განმავლობაში				
LHM	ვირთაგვაზე ან თაგვზე, არაპროგნოზირებადად ხდება ელექტროშოკით ზემოქმედება 3-7 დღის განმავლობაში.				

§3.5 ანორექსია

ანორექსია ფსიქიატრიული სინდრომია, რომელიც გულისხმობს მადის მნიშვნელოვან დაქვეითებას ან სრულ გაქრობას, კვების ობიექტური საჭიროების არსებობის ფონზე. აღნიშნულმა მდგომარეობამ შესაძლოა გამოიწვიოს მძიმე მეტაბოლური დარღვევები, ინფექციური ტიპის გართულებები და სხვა.

საზოგადოდ, კვებითი ქცევის კონტროლის ნერვული მექანიზმები საკმაოდ რთული და კომპლექსურია. მასში მონაწილეობას იღებენ ისეთი სტრუქტურები როგორებიცაა ტვინის ღერო, ჰიპოთალამუსი და ნეოკორტექსი. თავისთავად ცხადია, ფსიქიკური აშლილობების უმეტესობის მსგავსად, ანორექსიაც არაერთმნიშვნელოვანი დაავადებაა და მისი ეტიოპათოგენეზის პოლარიზება ერთ რომელიმე ფაქტორამდე დაყვანით, იქნება ეს გენეტიკური, ფიზიოლოგიური თუ ფსიქოლოგიური, არასერიოზული

იქნება. მიუხედავად ამისა, მნიშვნელოვანია ფუნდამენტურად იქნას გამოკვლეული მისი ბიოლოგიური მხარე, ის ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური ძვრები, რომლებიც აღნიშნული პათოლოგიის დროს პირველად თუ მეორეულად მიმდინარეობს. ამისათვის შექმნილია ანორექსიის რამდენიმე ცხოველური მოდელი, რომლებიც ძირითადად ლაბორატორიულ მღრღნელებისთვისაა განკუთვნილი, ესენია: (1) აქტივობაზე დაფუძნებული ანორექსია (Activity-Based Anorexia, იგივე ABA); (2) ვალინ-დეფიციტური დიეტა; (3) დეჰიდრატაციით ინდუცირებული ანორექცია; (4) შემაკავებელი სტრესით გამოწვეული ანორექსია (Scharner & Stengel, 2021).

§3.5.1 აქტივობაზე დაფუძნებული ანორექსია (ABA)

ანორექსიის კვლევაში ყველაზე პოპულარულ და ამასთანავე, ყველაზე სანდოდ მიჩნეულ მეთოდს წარმოადგენს ე.წ. აქტივობაზე დაფუძნებული ანორექსია (Activity-Based Anorexia, იგივე ABA). ეს მოდელი განკუთვნილია ლაბორატორიული მღრღნელებისათვის და გულისხმობს კვების შეზღუდვის კომბინაციას სარბენ ბორბალში სირბილის შესაძლებლობასთან. სქემა ასეთია, ცხოველი იკვებება დღეში რამდენიმე საათი და ამის ფონზე მას ეძლევა საშუალება ირბინოს ბორბალში. ბორბალზე წვდომა მეცნიერთა ერთი ნაწილისათვის უნდა იყოს მუდმივი (24სთ), ხოლო მეორე ნაწილი კი თვლის, რომ კვების საათებში, მასზე წვდომა ცხოველს არ უნდა ჰქონდეს. ფაქტობრივად, ორივე ეს მიდგომა მისაღები და ვალიდურია. ცდისთვის უხშირესად, გამოიყენება ახალგაზრდა ვირთაგვა ან თავი (თუმცა მოდელი მუშაობს ზრდასრულ ინდივიდებზეც). ვირთაგვების შემთხვევაში ცხოველებს საკვებზე წვდომა აქვთ დღეში 1-2 საათის განმავლობაში, ხოლო თავგვების შემთხვევაში შეზღუდვა უნდა მოხდეს ეტაპობრივად, მაგ. 24 საათიანი წვდომიდან პირველი სამი დღე შემცირდეს 6 საათამდე და შემდგომ დავიდეს 3 საათამდე დღეში. ექსპერიმენტული მოდელის მისაღებად აღნიშნული სქემა გამოიყენება 3-10 დღე, თუმცა ოპტიმალურად შეგვიძლია მივიჩნიოთ ერთი კვირა. აღნიშნული მოდელის ნაკლს წარმოადგენს ის ფაქტი, რომ იგი საკმაოდ მწვავეა და არ გამოხატავს ანორექსიის ქრონიკულ მიმდინარეობას სრულად. ამისათვის შეიქმნა რამდენიმე მოდეფიკაცია, ე.წ. ქრონიკული ABA მოდელი. ამისათვის ვირთაგვები ყოველდღიურად იღებენ დღიური ნორმის 40% -ს იქამდე სანამ მათი სხეულის მასა არ შემცირდება 20-25% -ით. ამის შემდგომ იწყება ე.წ. ქრონიკული ფაზა, რომლის დროსაც ცხოველები იღებენ საკვებს იმ რაოდენობით, რომ შეინარჩუნონ აღნიშნული წონა, 14 დღის მანძილზე. თავგებისთვის შესაძლოა გამოიყენებულ იქნას შემდეგი პროტოკოლი: 3 დღე დღიური ნორმის 30%, შემდეგ ექსპერიმენტის დასრულებამდე - 50%. პარალელურად 24 საათიანი წვდომა სარბენ ბორბალზე.

§3.5.2 ვალინ-დეფიციტური დიეტა

ზოგიერთი მკვლევარი ანორექსიის მოდელირებისთვის იყენებს ამინომჟავა ვალინით ღარიბ დიეტას. აღნიშნული დიეტა იწვევს საკვების მიღებისა და სხეულის მასის მნიშვნელოვან შემცირებას ვირთაგვებში, რაც ვლინდება მაღევე - 24 საათის შემდგომ.

§3.5.3 დეჰიდრატაციით ინდუცირებული ანორექცია

არსებობს ანორექსიის გამოწვევის კიდევ ერთი საინტერესო მეთოდი - დეჰიდრატაციით ანუ გაუწყლოვნებით გამოწვეული ანორექსია. ამისათვის ექსპერიმენტულ ცხოველებს (თავი ან ვირთაგვა) ერთადერთ სასმელ სითხედ მიეწოდება 2.5% -იანი NaCl -ის ხსნარი. როგორც წესი ექსპერიმენტის ხანგრძლივობა 5-7 დღეა.

§3.5.4 შემაკავებელი სტრესით გამოწვეული ანორექსია.

ანორექსიის მოდელირების ეფექტურ მეთოდად მიიჩნევა ე.წ. შემაკავებელი სტრესი. ამისათვის უპირველესად საჭიროა შემაკავებელი სტრესის გამოწვევი ხელსაწყო, რომელიც საკმაოდ მარტივი დასამზადებელია. ამისათვის უნდა ავიღოთ 50მლ მოცულობის პლასტმასის სინჯარა, რომელსაც უნდა გავუკეთოთ 6-12 ხვრელი, რათა ცხოველმა შეძლოს სუნთქვა. აღსანიშნავია, რომ ხვრელი უნდა იყოს საკმარისად დიდი, ჰაერის მოძრაობისათვის, თუმცა საკმარისად მცირე, რათა ცხოველმა ვერ შეძლოს მასში ცხვირის შეყოფა. აპარატი, ყოველი სეანსის შემდეგ აუცილებლად უნდა გაირეცხოს და გამშრალდეს მის განმეორებით გამოყენებამდე. ექსპერიმენტის დაწყებამდე თავგები უნდა დაიყოს 3-4 ინდივიდად გალიაში, რომლებიც გაივლიან 7 დღიან აკლიმატიზაციას. ამ პერიოდის განმავლობაში სასურველია მკვლევარებმა ყოველდღიურად აიყვანონ ისინი ხელში რათა მოხდეს ხელში აყვანით გამოწვეული სტრესის გავლენის თავიდან აცილება. ამის შემდგომ იწყება უშუალოდ მოდელირება, რომელიც პირობითად ორ ნაწილად შეიძლება დაიყოს: პირველ ეტაპზე საჭიროა დადგინდეს თითოეული ინდივიდის დღიური კვებითი ნორმა, ამისათვის უნდა მოხდეს მათთვის განსაზღვრული რაოდენობა საკვების მიცემა ყოველდღიურად და ამ საკვების სხვაობის დაანგარიშება 1, 2 და 24 საათის შემდგომ (საშუალოდ 3-5გ/24სთ/თავი), 3-5 დღის განმავლობაში. ამის შემდგომ იწყება მეორე ეტაპი, ე.წ.

შემაკავებელი სტრესი, რისთვისაც ცხოველი უნდა ავიყვანოთ კუდი და მოვათავსოთ ზევით აღწერილ აპარატში (ჯერ თავი, შემდეგ მთელი ტანი მათ შორის კუდი), 60 წუთის განმავლობაში. ამის პარალელურად ამავე დროის მანძილზე, საკონტროლო თავგებს უნდა შეეზღუდოთ წვდომა საკვებსა და წყალზე. ამის შემდგომ უნდა განმეორდეს ექსპერიმენტის პირველი ეტაპი (კვება და აღწერა), 7-10 დღის განმავლობაში.

§3.6 ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობა (OCD)

ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობა (OCD) მდგომარეობაა, რომელიც ხასიათდება არასასურველი აზრებით (ობსესიის), აკვიატებული შიშებით (ფობიის) და მათგან პროვოცირებული განმეორებადი, იძულებითი ქცევით (კომპულსიის). ეს აკვიატებები და იძულება ხელს უშლის ადამიანს ყოველდღიურ საქმიანობაში და იწვევს მნიშვნელოვან დისტრესს. პაციენტები ხშირად ცდილობენ უგულებელყონ ან შეაჩერონ ეს აკვიატება, მაგრამ ეს მხოლოდ ზრდის დისტრესს და შფოთვას. საბოლოო ჯამში, OCD -ის მქონე პაციენტებში, მიუხედავად მცდელობისა, ყურადღება არ მიაქციონ ან გათავისუფლდნენ შემაშფოთებელი აზრებისა თუ მოთხოვნილებებისგან, აკვიატებები კვლავ იჩენს თავს. ეს აძლიერებს რიტუალური ქცევის მოთხოვნილებას და იკვრება OCD -ის მანკიერი ციკლი. აღნიშნული სიმპტომატика ხშირად ორიენტირებულია გარკვეულ თემებზე — მაგალითად, მიკრობებით დაბინძურების გადაჭარბებული შიში, რომლის შესამსუბუქებლად, შეგიძლიათ იძულებით, ზოგჯერ კანის სერიოზულ დაზიანებამდე კი დაიბანოთ ხელები. აკვიატებებისათვის დამახასიათებელი თემატიკაა: ჭუჭყისა და მიკრობების შიში; საგანთა სიმეტრიულობა და გარკვეულ წესრიგში მოყვანა; არასასურველი, აგრესიული სინაარსის მატარებელი აზრები და სხვა. ობსესიით გამოწვეული განმეორებადი ქცევები — კომპულსიები, დაკავშირებულია შფოთის შემცირების მცდელობასთან. ისინი შესაძლოა გამოიხატოს დაღაგებით; ერთი და იმავე მოქმედების აკვიატებული გადამოწმებით (მაგ. კარის საკეტის; გაბჭურის და სხვა); დათვლით; საგნების გარკვეულ წესრიგში მოყვანით და ა.შ. OCD, ჩვეულებრივ იწყება მოზარდობის ასაკში, მაგრამ ის შეიძლება დაიწყოს ბავშვობაშიც. სიმპტომები, როგორც წესი, თანდათანობით იწყება და სიმძიმის მიხედვით იცვლება მთელი ცხოვრების განმავლობაში. აკვიატებებისა და იძულების ტიპები, რომლებსაც განიცდიან, ასევე შეიძლება შეიცვალოს დროთა განმავლობაში. სიმპტომები ზოგადად უარესდება, როდესაც განიცდიან დიდ სტრესს. OCD -ს, რომელიც ჩვეულებრივ განიხილება უწყვეტ აშლილობად, შეიძლება ჰქონდეს მსუბუქი და ზომიერი სიმპტომები ან იყოს იმდენად მძიმე, რომ გამოიწვიოს ადამიანის შესაძლებლობების გამოხატული შეზღუდვა და ინვალიდობა. ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობის (OCD) ზუსტი მიზეზი უცნობია, მაგრამ ის სავარაუდოდ მრავალფაქტორულია. არსებობს მონაცემები გენეტიკური პრედისპოზიციის შესახებ, იმდენად რამდენადაც OCD -ის შემთხვევათა 45-65% გენეტიკურ ფაქტორებს უკავშირებენ. ამასთან, ცხოველებსა და ადამიანებზე ექსპერიმენტებმა გამოავლინა ნმDA რეცეპტორის მუტაციის კავშირი OCD-ის მსგავსი ქცევის ზრდასთან. ასევე ნაჩვენებია, რომ ნმDA რეცეპტორის NR2 სუბერთეულის მუტაციები დაკავშირებულია დაბინძურების და იძულებითი გაწმენდის აკვიატებებთან. ტვინის დარღვეული რეგიონები OCD -ის დროს, მოიცავს დორსოლატერალურ პრეფრონტალურ ქერქს (DLPC), წინა ცინგულატურ ქერქს (ACC), ბაზალურ განგლიებს, ორბიტო-ფრონტალურ ქერქს (OFC), ზოლიან სხეულს, ამიგდალას, თალამუსსა და ტვინის ღეროს. სავარაუდოა დოფამინერგული და გლუტამატერგული აქტივობის ზრდა, ფრონტო-სტრიატურ გზებზე და შემცირებული სეროტონერგული და GABA-ერგული ნეიროტრანსმისიის ფრონტოლიმბურ სისტემებში. ხაზგასასმელია, რომ ზოგიერთ ფსიქიატრიულ მედიკამენტს შეუძლია შეამსუბუქოს OCD -ის მიმდინარეობა. მათგან ყველაზე ფართოდ გამოიყენება ისეთი ანტიდეპრესანტები, როგორებიცაა: კლომიპრამინი (ანაფრანილი); ფლუოქსეტინი (პროზაკი); პაროქსეტინი (პაქსილი); სერტრალინი (ზოლოფტი) და სხვა.

მიუხედავად იმისა, რომ შესაძლოა ერთი შეხედვით სრულიად წარმოუდგენელია, ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობის მოდელირება ლაბორატორიულ ცხოველებში, არსებობს ამის არაერთი მეთოდი, რომელთა შორის შესაძლებელია გამოვარჩიოთ სამი ძირითადი მიდგომა: (1) გარემო-პირობების მოდიფიკაცია; (2) ნეონატალური მოდელი და (3) ქიმიურად ინდუცირება ზრდასრულ ცხოველებში (Alonso et al., 2015; Camilla d'Angelo et al., 2014; Goodman et al., 2014; Szechtman et al., 2017).

§3.6.1 გარემო-პირობების მოდიფიკაცია

ნათელია, რომ გარემოპირობები დიდწილად განაპირობებენ ადამიანთა თუ ცხოველთა ქცევას, შესაბამისად შესაძლებელია მათი სპეციფიკური მოდიფიკაციით მივაღწიოთ სასურველ ქცევით ცვლილებებს. ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობის შემთხვევაში, ასეთ მოდიფიკაციას წარმოადგენს გრაფიკით კვებით გამოწვეული პოლიდიფსიის მოდელი (ინგლ. *Schedule-induced polydipsia (SchIP)*). აღნიშნული მეთოდი ეფუძნება დაკვირვებას, რომ ვირთაგვები, რომლებსაც საკვები მიეწოდებათ გრაფიკით, მხოლოდ განსაზღვრული დროითი ინტერვალებით და ამასთან აქვთ თავისუფალი წვდომა

წყალზე, 3-5 კვირაში ავითარებენ ანომალურ პოლიდიფსიურ ქცევას და სვამენ ნორმალურზე 5-10 -ჯერ მეტი მოცულობის წყალს. იქიდან გამომდინარე, რომ წყლის ასეთი განმეორებადი, არაადეკვატური, ძღვარგადასული და აკვიატებული სმა, შესაძლოა ჩაითვალოს კომპულსიურ ქცევად და ამასთან, აღნიშნულის საწინააღმდეგოდ ეფექტურია რიგი ანტიდეპრესანტული საშუალებები, ეს მოდელი ვალიდურია OCD -ის მიმდინარეობის შესწავლისათვის. (ცხრილი 28)

§3.6.2 ნეონატალური მოდელი

ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობის მოდელირების მეთოდებში, ერთ-ერთი ყველაზე ეფექტური ნეონატალური ასაკის ვითარებებზე ქიმიურად ზემოქმედებით ინდუცირებული მოდელია. ეს გულისხმობს ახალშობილ ვირთაგვებში (დაბადებიდან 9-16 დღის ასაკში), კლომიპრამინის ინტრა-პერიტონეულ ინექციებს, დოზით 15მგ/კგ. აღნიშნული მეთოდი შემუშავდა 2010 წელს ანდერსენისა და მისი კოლეგების მიერ (Andersen et al). (ცხრილი 28)

§3.6.3 ქიმიურად ინდუცირებული მოდელი

ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობის ქიმიურად ინდუცირებისათვის განიხილება ორი ძირითადი ნივთიერება, ესენია დოფამინის D₂ და D₃ რეცეპტორების სელექტიური აგონისტი ქვინპიროლი და 5-HT_{1A} რეცეპტორთა პირველი სრული აგონისტი 8-OH-DPAT. ქვინპიროლი საკმაოდ ფართოდ გამოყენებადი ნივთიერებაა ნეირობიოლოგიაში. ნანახია, რომ მისი ინტრაპერიტონეალური ინექციები თეთრ ლაბორატორიულ ვირთაგვებში, დოზით 0.5მგ/კგ, იწვევს OCD -ის მსგავს ცვლილებებს. რაც შეეხება 8-OH-DPAT -ს, იგი პირველად გასული საუკუნის 90-იან წლებში, იადინისა და მისი კოლეგების მიერ იქნა გამოყენებული, როგორც OCD -ის გამომწვევი ნივთიერება (Yadin et al. 1991) და დღესაც აქტიურად გამოიყენება. ობსესიურ-კომპულსიური აშლილობის მსგავსი მდგომარეობის გამოწვევისათვის საჭიროა 8-OH-DPAT -ის ინტრაპერიტონეული ინექციები, რვა დღის განმავლობაში. (ცხრილი 28)

ცხრილი 28. მეთოდოლოგიური მითითებები

მეთოდი	ცხოველი	დოზა	შეყვანის ფორმა	ხანგრძლივობა
8-OH-DPAT	ვირთაგვა	1მგ/კგ/დღე	I.P	8 დღე
8-OH-DPAT	ვირთაგვა	2მგ/კგ/დღე	I.P	8 დღე
ქვინპიროლი	ვირთაგვა	0.5მგ/კგ/დღე	I.P	2-ჯერ კვირაში ; 5კვირა
კლომიპრამინი	ვირთაგვა, (9-16 დღის)	15მგ/კგ/დღე	I.P	16 დღე
PDM	3-5 კვირის განმავლობაში, ვირთაგვებს საკვები მიეწოდებათ განსაზღვრული, უცვლელი გრაფიკით, ამასთან, ხდება დაკვირვება მათ მიერ მოხმარებული წლის მოცულობაზე.			

§3.7 ყურადღების დეფიციტისა და ჰიპერაქტიურობის აშლილობა

ყურადღების დეფიციტის/ჰიპერაქტიურობის აშლილობა (ADHD) არის ნეიროგანვითარების აშლილობა, რომელიც ვლინდება უყურადღებობის, ჰიპერაქტიურობისა და იმპულსურობის მუდმივი შაბლონებით, რომლებიც ხელს უშლის ადამიანის სრულფასოვან ფუნქციონირებასა და განვითარებას. როგორც წესი, დიაგნოზირება ხდება ბავშვობის ასაკშივე, ვინაიდან ADHD-ის სიმპტომები უხშირესად ვლინდება 12 წლამდე და შესაძლოა გაგრძელდეს ზრდასრულ ასაკში. უყურადღებობა ხასიათდება ყურადღების შენარჩუნების სირთულეებით, ხოლო ჰიპერაქტიურობა მოიცავს გადაჭარბებულ რხევას, მჯდომარე მდგომარეობაში დარჩენის შეუძლებლობას და გადაჭარბებულ ლაპარაკს. აღნიშნული დიაგნოზისათვის კიდევ ერთი სახასიათო სიმპტომია იმპულსურობა, რომელიც ვლინდება როგორც ნაჩქარევი ქმედებები წინასწარგანზრახვის გარეშე და მოუთმენლობა. ADHD-ის ეტიოლოგია მოიცავს გენეტიკური, გარემო და ნევროლოგიური ფაქტორების კომპლექსურ ურთიერთქმედებას. ნეირო-ვიზუალიზაციურმა კვლევებმა გამოავლინა სტრუქტურული და ფუნქციური განსხვავებები ADHD-ის მქონე პირების ტვინში,

განსაკუთრებით იმ რეგიონებში, რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან ყურადღებასა და აღმასრულებელ ფუნქციებზე, როგორიცაა პრეფრონტალური ქერქი და ბაზალური განგლიები. ნეიროტრანსმიტერების დისბალანსს, განსაკუთრებით დოფამინისა და ნორეპინეფრინის, ასევე მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს ADHD-ის პათოგენეზში. მკურნალობის მიდგომები, როგორც წესი, მოიცავს ქვევით თერაპიას, ფსიქოგანათლებას და ფარმაკოლოგიურ ინტერვენციებს, ჩვეულებრივ ინიშნება მასტიმულირებელი მედიკამენტები, როგორიცაა მეთილფენიდატი და ამფეტამინის წარმოებულები. ცხოველური მოდელები გადამწყვეტია ADHD-ის შესასწავლად და მკურნალობის ახალი მიდგომების შემუშავებისათვის. ერთ-ერთი ფართოდ გამოყენებული მოდელია ე.წ. სპონტანური ჰიპერტენზიული ვირთავის მოდელი (SHR), რომელიც ავლენს ჰიპერაქტიურობას, იმპულსურობას და ყურადღების დეფიციტს, მსგავსად ადამიანის ADHD-ისა. SHR გამოიყენება აშლილობის ნეირობიოლოგიური საფუძვლების შესასწავლად და ფარმაკოლოგიური მკურნალობის ეფექტურობის შესაფასებლად. სხვა მოდელებიდან აღსანიშნავია ახალშობილთა 6-ჰიდროქსი-დოპამინით (6-OHDA) ვირთავების ინტოქსიკაცია, რაც ამცირებს კატექოლამინების რაოდენობას და იწვევს ჰიპერაქტიურობასა და ყურადღების დეფიციტის განვითარებას, რაც ასახავს ADHD-ში დაფიქსირებულ დოფამინერგულ დისრეგულაციას. გარდა ამისა, მღრღნელებისთვის ფსიქო-სტიმულატორების შეყვანამ, როგორიცაა ამფეტამინი ან მეთილფენიდატი, შეიძლება გამოიწვიოს ჰიპერაქტიურობა და ყურადღების დაქვეითება, ADHD-ის ქვევითი სიმპტომების მსგავსად (Rahi & Kumar, 2021; Regan et al., 2022; Russell et al., 2011; Sontag et al., 2010; Vázquez et al., 2022). ეს მოდელები გვხმარება ADHD-თან დაკავშირებული ნეიროქიმიური ცვლილებების გაგებაში და პოტენციური თერაპიული აგენტების ტესტირებაში. უფრო დეტალურად ზოგიერთი პრეპარატის გამოყენების პრინციპები წარმოდგენილია ქვევით, ცხრილი 29-ში.

ცხრილი 29. მეთოდოლოგიური მითითებები

ნეიროტოქსინი	ცხოველი	დოზა	შეყვანის ფორმა	ხანგრძლივობა
მეთილფენიდატი	ვირთავა	2-10მგ/კგ	I.P	x1, 14 დღე
ამფეტამინი	თავი	2.5-5მგ/კგ	I.P	x1, 10 დღე
ქუინპიროლი	ვირთავა	0.5-1.0მგ/კგ	I.P	x1, 14 დღე
6-OHDA	ვირთავა	100-300მგ/კგ	I.C	x1, 7 დღე
Pb (ტყვია)	ვირთავა	250ppm	სასმელ წყალში	30 დღე
ნიკოტინი	ვირთავა	0.3-0.6მგ/კგ	S.C	x1, 14 დღე

ფ3.8 აუტისტური სპექტრის აშლილობა

აუტისტური სპექტრის აშლილობა, სხვაგვარად აუტიზმი, არის თავის ტვინის განვითარებასთან დაკავშირებული პათოლოგიურ მდგომარეობათა ჯგუფი, რომლებიც ხასიათდებიან სამი ძირითადი ნიშნით: სოციალური ურთიერთობების დაწყებისა და შენარჩუნების უნარის დეფიციტი; ინტერესთა ვიზრო სპექტრი; ხშირად განმეორებადი მოძრაობითი ქცევა. ტერმინი "სპექტრი", აუტისტური სპექტრის აშლილობის კონტექსტში, მიუთითებს სიმპტომებისა და სიმძიმის ფართო სპექტრზე. ზოგიერთი აუტიზმის სპექტრის აშლილობისას, ნიშნები, როგორიცაა თვალთ კონტაქტის შემცირება, სახელზე რეაგირების ნაკლებობა ან ოჯახის წევრებისადმი გულგრილობა, შეიძლება არ იყოს გამოხატული ცხოვრების პირველი რამდენიმე თვის ან წლის განმავლობაში, მაგრამ შემდეგ მოულოდნელად გამომჟღავნდნენ. აუტიზმისათვის სახასიათოა ისეთი სიმპტომები, როგორებიცაა: განმეორებითი მოძრაობები (რხევა; ტრიალი; ხელის არაადეკვატური ქნევა და სხვა); თვითდამაზიანებელი აქტივობები (მაგ. საკუთარი თავის კბენა; თავის განზრახ დარტყმა და სხვა); სივრცით კოორდინაციასთან დაკავშირებული პრობლემები (უცნაური და ხისტი მოძრაობები); კონცენტრირება საგნის ცალკეულ დეტალებზე, თუმცა საგნის და მისი დანიშნულების ერთიანად აღქმის არარსებობა; უჩვეულო მგრძნობელობა მხედველობით (სინათლე); სმენით (ხმაური) ან ტაქტილურ (ხელით შეხება) გამღიზიანებლებზე და სხვა. ლიტერატურაზე დაფუძნებით შეგვიძლია ვივარაუდოთ ASD -ის ეტიოლოგიის კავშირი გენეტიკურ, ბიოლოგიურ და გარემო ფაქტორებზე, თუმცა ამასთან, ზუსტი ეტიო-პათოგენეზი ჯერ კიდევ უცნობია. ლიტერატურული მონაცემების დიდი ნაწილი ASD -ს გენეტიკურ ფაქტორებთან აკავშირებს, ამასთან ნაწახია, რიგი

ნეირობიოლოგიური თავისებურებანი, როგორებიცაა ნეირონებისა და სინაფსების დაქვეითება ამიგდალაში, ჰიპოკამპსა და ნათხეში; ასევე, თავის ტვინის უჩვეულოდ დიდი ზომა და გლუტამატის კონცენტრაციის მატება. აუტისტური სპექტრის აშლილობის მკურნალობა დღესდღეობით მხოლოდ სიმპტომურადაა შესაძლებელი, შფოთისა და ჰიპერაქტიურობის შესამცირებლად, რისთვისაც გამოიყენება ანტიფსიქოზური და ანტიდეპრესანტული საშუალებები.

გემოთქმულიდან გამომდინარე ცხადია, რომ აუტისტური სპექტრის აშლილობა ერთ-ერთი ყველაზე შეუსწავლელია თანამედროვე ნეირომეცნიერებაში. მიუხედავად ამისა, არსებობს მოცემული დაავადების რამოდენიმე ცხოველური მოდელი, რომელთაგან ყველაზე ფართოდ გავრცელებული ე.წ. კლასიკური, ვალპროის მჟავის პრენატალური ადმინისტრაციით გამოწვეული მოდელია. მოგეხსენებათ ვალპროის მჟავა (VPA) ცნობილი ანტიეპილეფსიური პრეპარატია, რომელიც გარდა ეპილეფსიისა, გამოიყენება ბიპოლარული აშლილობისა და შაკიკის სამკურნალოდაც. ამასთან ცნობილია, რომ VPA -ს გააჩნია ტერატოგენური ეფექტები, მათ შორისაა აუტიზმის განვითარების მაღალი რისკი. მაგალითად კვლევებით ნანახია, რომ იმ ბავშვთა შორის, რომელთა დედაც იღებდა ვალპროის მჟავას ორსულობისას, 8.9% -ს განუვითარდა აუტისტური სპექტრის აშლილობა, მაშინ, როცა ჩვეულებრივ, მოსახლეობაში ეს მაჩვენებელი დაახლოებით 1% -ს უტოლდება (Chadman et al., 2019; Peñagarikano, 2017; Varghese et al., 2017). (ცხრილი 29)

ცხრილი 29. მეთოდოლოგიური მითითებები

ემბიონის ასაკი (დღე)	ცხოველი	დოზა (მგ/კგ)	შეყვანის ფორმა
9	თაგვი	200; 400; 800	I.P
9	თაგვი	400	S.C
9; 12.5; 14.5	თაგვი	500	I.P
12; 13; 14	თაგვი	100	I.P
12.5	თაგვი	500	I.P
13	თაგვი	600	S.C
7; 9.5; 12; 15	ვირთაგვა	400	I.P
9	ვირთაგვა	600	I.P
9; 11	ვირთაგვა	800	Per Os
11; 12; 13	ვირთაგვა	200	I.P
1.5	ვირთაგვა	500	I.P
1.5; 12; 12.5	ვირთაგვა	350	I.P
12	ვირთაგვა	400	I.P
12	ვირთაგვა	600	I.P
12.5	ვირთაგვა	600	I.P
12.5	ვირთაგვა	350	S.C
12.5	ვირთაგვა	350	I.P
12.5	ვირთაგვა	400; 500; 600	I.P
12.5	ვირთაგვა	500	I.P

ფ3.9 ალკოჰოლდამოკიდებულება და აბსტინენციური სინდრომი

ალკოჰოლზე (ან სხვაგვარად ალკოჰოლური) დამოკიდებულება, რომელსაც ხშირად ალკოჰოლიზმს უწოდებდნენ, პროგრესირებადი ფსიქიკური აშლილობაა, რომელიც განპირობებულია ეთილის სპირტის, ანუ ეთანოლის შემცველი სასმელების ან მათი სუროგატების ჭარბი და სისტემური მიღებით. ალკოჰოლური სასმელები, რომლებსაც მიეკუთვნება ღვინო, კონიაკი, ვისკი, არაყი, ლუდი, ჭაჭა, გრაპა, ჯინი და ა.შ., სხვადასხვა კონცენტრაციით შეიცავენ ეთილის სპირტს. ალკოჰოლიზმი ვლინდება პათოლოგიური ლტოლვით სპირტისშემცველი

პროდუქტებისადმი, ფსიქიკური და ფიზიკური დამოკიდებულების ფორმირებით, ალკოჰოლისადმი ტოლერანტობის ცვლილებით და თანმხლები ფსიქო-სოციალური და სომატო-ნევროლოგიური გართულებებით. გამომდინარე თქმულიდან ცხადია, რომ ალკოჰოლდამოკიდებულება იყო და დღემდე რჩება ფსიქიკური ჯანმრთელობის აქტუალური პრობლემა. ალკოჰოლი, ცნობილი, როგორც ეთანოლი, ეთილის სპირტი, ღვინის სპირტი, ეთილჰიდრატი, მეთილკარბინოლი, ან უბრალოდ „სპირტი“, ერთატომიანი სპირტია, ფორმულით $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--OH}$. სუფთა ეთანოლი პირველად VII საუკუნეში, არაბებმა მიიღეს და სიტყვა ალკოჰოლიც არაბული წარმოშობისაა, რაც თარგმანში „მათრობელს“ ნიშნავს. ეთანოლის ბიოქიმიაში არსებითია ის ფაქტი, რომ იგი ერთნაირადაა, როგორც ჰიდროფილური, ისე ლიპოფილური, მაშასადამე მარტივად ლახავს ყოველგვარ ბარიერს, უპრობლემოდ შეიწოვება კუჭ-ნაწლავის ტრაქტიდან და აქვს ნებისმიერ ქსოვილში, მათ შორის თავის ტვინში თავისუფლად შეღწევის უნარი. ადამიანის ორგანიზმში, გლუკოზის მეტაბოლიზმისას წარმოიქმნება მცირე რაოდენობით ენდოგენური ალკოჰოლიც, ამიტომ მისი აღმოჩენა ჯანმრთელი ადამიანის ორგანიზმშიცაა შესაძლებელი ($< 0,01\%$). მიღებული ალკოჰოლის 90% -მდე ღვიძლში მეტაბოლიზდება, ხოლო დარჩენილი 10% – თირკმლებისა (შარდთან ერთად) და ფილტვების (ამოსუნთქულ ჰაერთან ერთად) საშუალებით. ორგანიზმში მოხვედრილი ეთანოლის მეტაბოლიზმში ცენტრალური როლი ფერმენტ ალკოჰოლდეჰიდროგენაზას (ADH) უჭირავს, რომელიც ნიკოტინ-ამიდ-დინუკლეოტიდის (NAD^+) თანხლებით გარდაქმნის ეთანოლს აცეტალდეჰიდად ($\text{CH}_3\text{--CHO}$). აღწერილია ალკოჰოლდეჰიდროგენაზას 2 იზოფორმა: ADH1B და ALDH2 (ე.წ. მიტოქონდრიული ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა). აღსანიშნავია, რომ ამ პროცესში NAD^+ -ი აღდგება NADH -მდე, ხოლო წარმოქმნილი აცეტალდეჰიდი, რომელიც ტოქსიკური ნივთიერებაა, განაგრძობს მეტაბოლიზმს. არსებობს ეთანოლის აცეტალდეჰიდამდე მეტაბოლიზმის მეორე გზაც, რომელსაც ე.წ. MEOS-ი, ანუ ეთანოლის დამუხანგავი მიკროსომული სისტემა უზუნველყოფს. ეს სისტემა ძირითადად ციტოქრომ P450 ოჯახის ფერმენტებისაგან შედგება და პროცესს ნიკოტინამიდ-ადენინ-დინუკლეოტიდ-ფოსფატის ანუ NADPH -ის დაუხანგვით ახორციელებს. ამა თუ იმ გზით, ორგანიზმში მოხვედრილი ალკოჰოლი, ტოქსიკურ აცეტალდეჰიდად გარდაიქმნება, რაც ცხადია, საჭიროებს გაუნებელყოფას. ამას უზრუნველყოფს ღვიძლში არსებული მიტოქონდრიული ფერმენტი – NAD -დამოკიდებული ალდეჰიდდეჰიდროგენაზა. იგი ჟანგავს აცეტალდეჰიდს აცეტატამდე, რომელიც შემდგომ საბოლოო მეტაბოლიტებამდე – ნახშირორჟანგამდე და წყლამდე იჟანგება. ალკოჰოლის ცენტრალური ეფექტები, ადამიანისათვის ცნობილი ალკოჰოლის მიღების აღმოჩენამდეც კი ცნობილი იყო, მაშინ, როცა იგი მიირთმევდა ხილს, რომელშიც ფერმენტაციის პროცესი იყო დაწყებული. მისი ცნს -ზე მოქმედების ზუსტი მექანიზმი, ჯერჯერობით სრულად არაა შესწავლილი, თუმცა აშკარაა რამდენიმე ცხადი კორელაცია, ჩვენც სწორედ მათზე შევჩერდებით. უპირველესად, უნდა აღინიშნოს ეთილის სპირტის გავლენა გაემერგულ სისტემაზე. განსაკუთრებით, იგი მოქმედებს GABA_A ტიპის რეცეპტორებზე. უკავშირდება რა ეთანოლი GABA_A რეცეპტორის შესაბამის საიტს, ალაგზნებს მას და იწვევს გლუტამატ-გაემერგული, მაშასადამე აგზნება-შემაკავებელი ბალანსის გადახრას შეკავებისაკენ. ხანგრძლივი მოხმარებისას ე.წ. უკუკავშირის მექანიზმის გამო, გაემერგული რეცეპტორების რაოდენობა კლებულობს, რაც იმას ნიშნავს, რომ სასურველი თრობის ეფექტის მისაღწევად საჭიროა უფრო მაღალი დოზა. ამ ეფექტს ტოლერანტობას უწოდებენ. ამასგარდა, ალკოჰოლი ინჰიბირებს N-მეთილ-D-ასპარტატულ რეცეპტორებს (NMDA), რითაც კიდევ უფრო ზრდის შემაკავებელ ეფექტებს. ალკოჰოლის, როგორც ფიზიკური, ისე სულიერი ტკივილის გამაყუჩებელი ეფექტი დიდადაა დამოკიდებული 30 ამინომჟავისაგან შემდგარი ნეიროპეპტიდის – ბეტა-ენდორფინის სინთეზის სტიმულაციასთან. აღნიშნული ნეიროპეპტიდი, ჰიპოფიზის მელატონოტროპული უჯრედების მიერ სინთეზირდება პროოპიომელანოკორტინიდან და იწვევს ეიფორიას. ამდენად, ცხადი ხდება მიზეზები ალკოჰოლური თრობის სიმპტომების განვითარებისა, კერძოდ, დარღვეული მეტყველება და სივრცითი ორიენტაცია, სიმშვიდისა და „გაყუჩების“ განცდა. როდესაც ალკოჰოლდამოკიდებული ადამიანი უეცრად შეწყვეტს ალკოჰოლის მოხმარებას, ვითარდება ალკოჰოლის მოხსნის, სხვაგვარად ალკვეთის ანუ აბსტინენციის სინდრომი (AWS). როგორც წესი, აღნიშნული სინდრომის განვითარების მიზეზი ალკოჰოლდამოკიდებული ადამიანის ალკოჰოლზე წვდომის ამა თუ იმ მიზეზით შეზღუდვა ხდება (მაგ. ფინანსური ფაქტორები ან ამ თუ სხვა მიზეზით კლინიკაში მკურნალობა). აბსტინენციის სიმპტომები ალკოჰოლის მიღების შეწყვეტიდან დაახლოებით 6 საათში ვლინდება, თავის ძლიერი ტკივილის, ზოგადი სისუსტის, გაძლიერებული ოფლიანობის, კანკალის, გულისრევის, ღებინების სახით, ასევე რიგ პაციენტებში შესაძლოა განვითარდეს ეპილეფსიური გულყრები.

არსებობს ალკოჰოლიზმისა და აბსტინენციის რამდენიმე გავრცელებული მოდელი: (1) თავისუფალი არჩევანით სმაზე დაფუძნებული ალკოჰოლიზმი თავგებში; (2) თხევადი დიეტა ვირთაგვებში; (3)

ალკოჰოლის ორთქლით გამოწვეული მოდელი მღრღნელებში; (4) ალკოჰოლური აბსტინენციის სინდრომი მღრღნელებში (Becker, 2000; Goltseker et al., 2019; Tabakoff & Hoffman, 2000).

§3.9.1 თავისუფალი არჩევანით სმაზე დაფუძნებული ალკოჰოლიზმი თავგებში

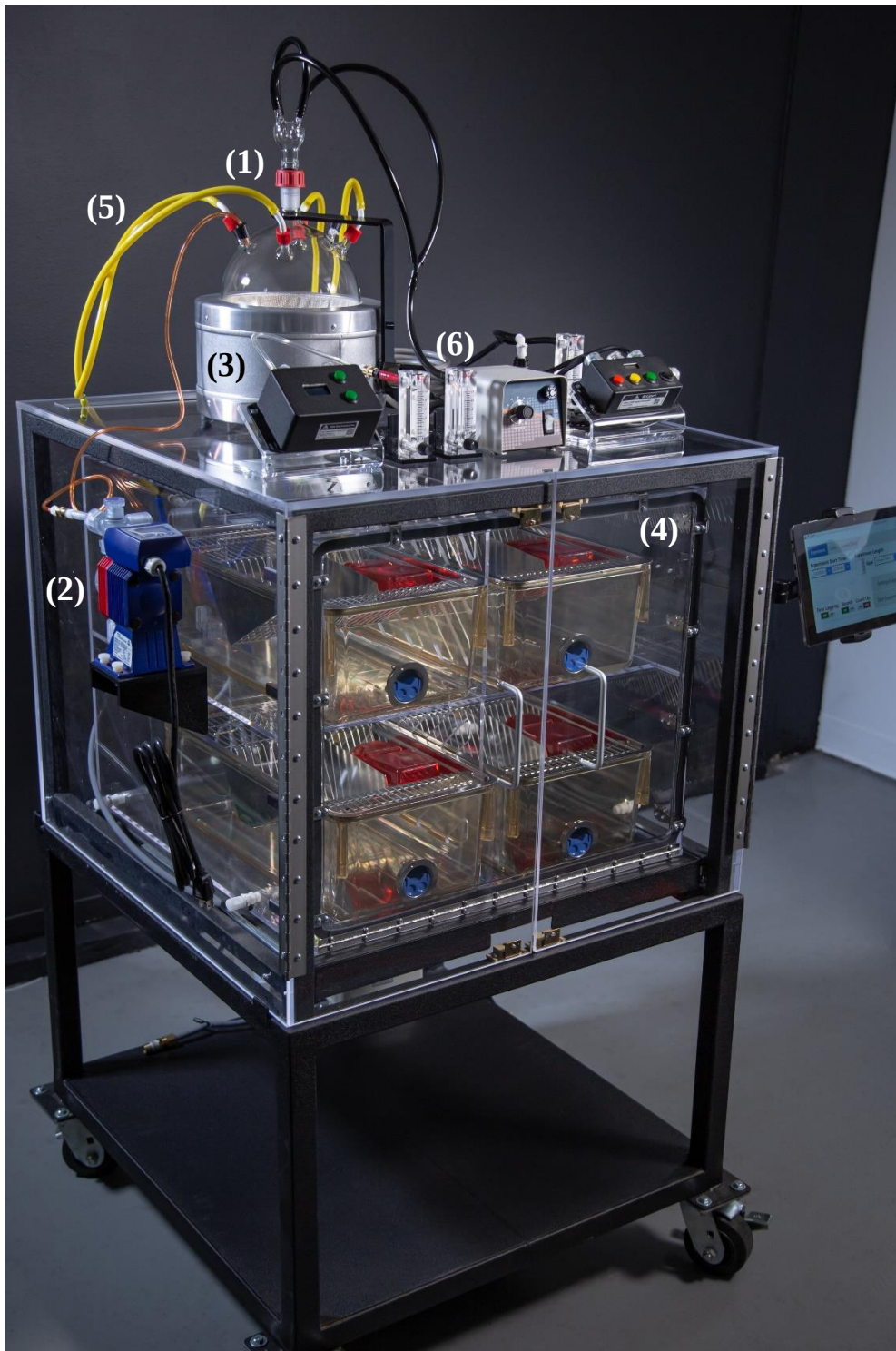
აღნიშნული მეთოდი გულისხმობს ლაბორატორიული თავგებისათვის 2 ბოთლის მიწოდებას გალიაში: პირველში ასხია სასმელი წყალი, ხოლო მეორეში 10-15% ეთილის სპირტის ხსნარი. მიწოდების ხანგრძლივობა შესაძლოა ვარიირებდეს 30 წუთიდან დღეში, 24 საათამდე. ოპტიმალურად მიიჩნევა 2 საათი, ეს დრო ერთისმხრივ საკმარისია რათა ცხოველებმა მიიღონ საჭირო რაოდენობით ალკოჰოლი, მეორესმხრივ საკმაოდ მოკლეა იმისათვის, რომ სარწმუნოდ შეფასდეს ალკოჰოლის კონცენტრაცია სისხლში (ე.წ. BEC). უპირატესობა ენიჭება ალკოჰოლის მიწოდებას ღამის საათებში (ბნელ ფაზაში), მოხმარების მაქსიმალიზაციის მიზნით. მოხმარებული მოცულობა აღიწერება ყოველი მიწოდების შემდეგ. ნანახია, რომ 15% -იანი ალკოჰოლის 2 საათიანი მიღება დაახლოებით 1-3 გ/კგ დოზის ტოლფასია. ასევე ე.წ. ხანგამოშვებითი მოდელი, მაგ. ყოველ მეორე დღეს მიწოდება ნაცვლად ყოველდღიურისა იწვევს მოხმარების გაზრდას და ასეთ დროს მიიღებული საშუალო დოზა აღემატება 9 გ/კგ -ს. ოპტიმალურად მიჩნეულია ალკოჰოლის კონცენტრაცია 8-16%, ვინაიდან კონცენტრაცია <8% ნაკლებ ეფექტურია (<4% საერთოდ არაა გამოხატული ეფექტი); ხოლო >16% ხსნარი ზედმეტად მწარეა, რაც ასევე ამცირებს მიდგომის ეფექტურობას. საჭიროებისამებრ, დასაშვებია ხსნარის დატკობა საქაროზით ან საქარინით. ხელით მუშაობის ცდომილების აღწერისათვის აუცილებელია კონტროლი ცარიელი გალიით, ანუ მთელი პროცედურის ჩატარება ცარიელ გალიაშიც.

§3.9.2 თხევადი დიეტა ვირთაგვებში

თხევადი დიეტა გულისხმობს ვირთაგვების კვებას მხოლოდ სპეციალური სითხით, რომლის ერთი ლიტრიც შეიცავს: 3გ ვიტამინების კომპლექსს, 5გ მარილს, 197მლ წყალს, 92მლ 95% -იან ეთანოლს და 711მლ საკვებ სითხეს ცილის მაღალი შემცველობით (მაგ. Biotin ან სხვა ამგვარი). აღნიშნულ სითხეში ალკოჰოლის კონცენტრაცია დაახლოებით 9.2% -ის ტოლია, რაც იმას ნიშნავს რომ ალკოჰოლიდან მიღებული კალორიები სითხიდან მიღებული კალორიების 41% -ს შეადგენს. საკონტროლო ჯგუფში ალკოჰოლის ნაცვლად შეგვაქვს საქაროზა, ექვივალენტური კალორული, რაც 126გ/ლ უტოლდება. საშუალოდ მღრღნელები დღეში იღებენ 9.5მლ ეთანოლს კილოგრამ წონაზე. მოდელირების ხანგრძლივობა დაახლოებით 7-14 დღის ტოლია.

§3.9.3 ალკოჰოლის ორთქლით გამოწვეული მოდელი მღრღნელებში

თანამედროვე ლიტერატურაში გავრცელებულია ე.წ. ალკოჰოლის ორთქლით გამოწვეული ალკოჰოლდამოკიდებულების მოდელები. ამისათვის აუცილებელია ამოორთქლებელი სისტემის აწყობა. აღნიშნული სისტემა შედგება რამდენიმე ცენტრალური დანადგარისაგან: (1) მინის მრგვალძირა კოლბა, რომელშიც (2) ტუმბოს საშუალებით ჩაედინება 96% -იანი ალკოჰოლი ძირითადი რეზერვუარიდან. აღნიშნული კოლბა განთავსებულია (3) გამაცხელებელ მოწყობილობაზე, რომელიც აორთქლებს სპირტს. აორთქლებული ალკოჰოლი (4) გალიებთან ჰერმეტიკულად დაკავშირებული (5) მილების საშუალებით მიემართება გალიებისაკენ. გალიები აუცილებლად უნდა იყოს უზრუნველყოფილი ჰაერით. მიწოდებული ორთქლის ნაკადი რეგულირდება (6) მანომეტრების საშუალებით. ალკოჰოლის ორთქლის მიწოდება შესაძლებელია სხვადასხვა გრაფიკით, მაგ. ჩართული/გამორთული: 14სთ/10სთ; 2სთ/22სთ; 12სთ/12სთ და ა.შ. აღნიშნული გრაფიკის კონტროლი ხორციელდება სისტემასთან დაკავშირებული ტაიმერის საშუალებით. (სურათი 6)



სურათი ნ. ალკოჰოლის ამორთვლებელი.

§3.9.4 ალკოჰოლური აბსტინენციის სინდრომი მღრღნელებში.

ალკოჰოლური აბსტინენციის მოდელირება ლაბორატორიულ მღრღნელებში არცთუ ისე რთული საქმეა. ამისათვის საჭიროა ეთანოლის 25% -იანი ხსნარის ინტრაგასტრალური მიწოდება დოზით 5გ/კგ/დღეში, 14 დღის განმავლობაში. რის შემდეგაც მიწოდებას ვწყვეტთ. შეწყვეტიდან დაახლოებით 48 საათში ვითარდება აბსტინენცია (Goltseker et al., 2019; Tabakoff & Hoffman, 2000).

თავი IV

ქცევითი კვლევის მეთოდები

როგორც დასაწყისშივე ვთქვით, ექსპერიმენტულ ცხოველთა ქცევითი აქტივობის შეფასება ცენტრალურ როლს თამაშობს როგორც მოდელის ვალიდობის, ისე ამა თუ იმ ნივთიერების თერაპიული ეფექტის შეფასებაში. ის გვაძლევს ინფორმაციას ცხოველის ფიზიკურ, ფიზიოლოგიურ და ფსიქომოციურ მდგომარეობაზე, კერძოდ, ქცევითი ტესტების საშუალებით შესაძლებელია დავადგინოთ ცხოველის შფოთვის, ემოციური დათრგუნვის ან პირიქით — აჟიტაციის, კვლევითი ინტერესის დონე, კოორდინაციისა და სივრცითი ორიენტაციის უნარი და სხვა ფიზიოლოგიური მახასიათებლები. აღნიშნული ძალიან აქტიურად გამოიყენება მოლეკულურ ფსიქიატრიაშიც, ვინაიდან ისეთი პათოლოგიური მდგომარეობები, როგორებიცაა დეპრესია, შფოთვითი აშლილობა, შიზოფრენია, OCD და სხვა პირდაპირ აისახება ცხოველის ქცევაზე.

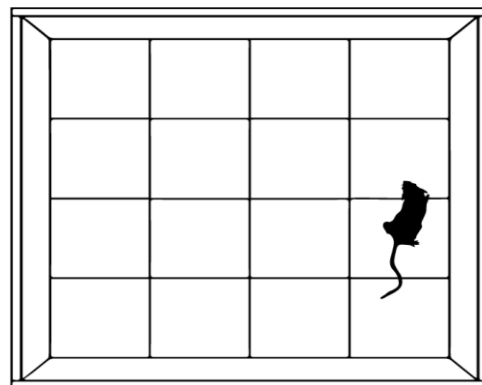
§4.1 ღია ველის ტესტი (Open Field)

ღია ველი, ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული და მრავალმხრივ ინფორმატიული ქცევითი ტესტია. იგი ჩვეულებრივ არის დახურული სივრცე, კვადრატული, მართკუთხა ან წრიული ფორმის კედლებით, რომლებიც ხელს უშლის ცხოველის გაქცევას, ხოლო ზემოდან აღნიშნული სივრცე ღიაა და სწორედ ასე ხდება ობიექტზე დაკვირვება თვალის, ან სპეციალური აპარატის საშუალებით. ჩვეულებრივ ველის ძირი დაყოფილია კვადრატებად, ცენტრი კი მონიშნულია განსხვავებული ფერით, რათა მისი გარჩევა დანარჩენი სივრცისაგან გაადვილდეს.

საჭირო დანადგარი:

ღია ველი

- კვადრატული ფორმის აპარატის ზომები:
42-100 სმ (სიგრძე) x 42-100 სმ (სიგანე) x 38 - 80 სმ (სიმაღლე)
- მართკუთხა ფორმის აპარატის ზომები:
40-60 სმ (სიგრძე) x 60-80 სმ (სიგანე) x 38-70 სმ (სიმაღლე)
- წრიული ფორმის აპარატის ზომები:
80-150 სმ (დიამეტრი) x 80 სმ (სიმაღლე)



სურათი 7. ღია ველის კამერა.

ტესტი ეფუძნება ცხოველის ტენდენციას გამოიკვლიოს ახალი ტერიტორია და თავიდან აიცილოს კაძკაძა შუქი რომელიც ცენტრშია. ტესტი იწყება ცხოველის მოთავსებით ცენტრში და გრძელდება 5-10 წუთი. ჩასმის შემდგომ ცხოველი იწყებს კედლისკენ გადაადგილებას, აღსანიშნავია, რომ საცდელი ობიექტის მიერ ცენტრში შესვლათა დიდი რაოდენობა მიუთითებს შფოთვის დაბალ დონეზე, ხოლო კედლებთან ახლოს ყოფნა — შფოთვის მაღალ დონეზე.

ქცევის შეფასება:

- განვლილი უჯრების რაოდენობა:** თუ რა რაოდენობით გაიარა ცხოველმა თითოეული უჯრა ოთხივე თათით, მიუთითებს მის მოტორულ აქტივობაზე.
- ცენტრში ყოფნის ხანგრძლივობა:** მიუთითებს, თუ რა დრო დაჰყო ცხოველმა ველის ცენტრში. შესაძლებელია აღიწეროს არა დრო, არამედ ცენტრში შესვლათა რაოდენობა. ორივე ზემოთქმული პარამეტრით შესაძლოა ვიმსჯელოთ ცხოველის შფოთვის დონეზე.
- უკანა თათებზე დგომა:** თუ რამდენჯერ დადგა ცხოველი უკანა თათზე, მიუთითებს მის კვლევით აქტივობაზე.
- გაწევა:** ეს გულისხმობს ცხოველის მიერ წინა კიდურების წამოწევას და შემდეგ უკან დახევას. აღნიშნულიც შფოთვითი მდგომარეობის მანიშნებელია.
- მოვლა ანუ გრუმინგი:** დროის ის ხანგრძლივობა, როდესაც ცხოველი თავის ისუფთავებს.
- უმოდრაობა:** დროის ხანგრძლივობა, როდესაც ცხოველი სრულიად ჩერდება.

§4.2 შევიწროვებადი ბილიკის ტესტი (The Beam walking test)

შევიწროვებადი ბილიკი შედგება ორი ერთმანეთზე დამაგრებული ტოლფერდა ტრაპეციისგან სივრცით 100-120სმ-მდე და პლათფორმის შუაში სიმეტრიულად ზემოდან დამაგრდება შედარებით მცირე ზომის ბილიკი სადაც თავსდება ობიექტი. შევიწროვებად ნაწილში მოთავსებულია ცხოველისათვის ნაცნობი არე, როგორიცაა გალია. ბილიკი იატაკიდან დაშორებულია 100-150სმ-ით და მის ქვემოთ გაბმულია ბადე, რომელიც ხელს უშლის ობიექტს გაქცევისგან.

საჭირო დანადგარი:

შევიწროვებადი ბილიკი

- ქვედა ბილიკის ზომები: საწყისი ნაწილი 4-10სმ (სიგანე), ბოლო ნაწილი 2.2 – 5.5სმ(სიგანე); სიმაღლე – 1-3სმ.
- ზედა ბილიკის ზომები: საწყისი ნაწილი 2-ნსმ(სიგანე), ბოლო ნაწილი 0.5-1.5სმ(სიგანე); სიმაღლე 2-4სმ



სურათი 8. შევიწროვებადი ბილიკი.

შევიწროვებადი ბილიკის ტესტი გამოიყენება მღრღნელებში მოტორული კოორდინაციისა და წონასწორობის შესაფასებლად, განსაკუთრებით ექსპერიმენტულ მოდელებში, რომლებიც დაკავშირებულია მოტორიკის ცვლილებასთან. ცხოველი თავსდება ბილიკის ფართე ნაწილში სახით გალიისკენ. სრულყოფილი შედეგების მისაღებად აუცილებელია 2-3 დღის განმავლობაში დღეში ერთხელ ჩატარდეს შეგუებითი ტესტი და მხოლოდ ამის შემდგომ კვლევითი. ცდის ხანგრძლივობა არ უნდა აღემატებოდეს 60 წამს, თუ ობიექტი უმოძრაო მდგომარეობაშია, სიარულის სტიმულირება შესაძლებელია კუდზე მსუბუქი დარტყმებით და რეკომენდირებულია ანალოგიური ქმედება სხვა ობიექტებზეც, რადგან ერთნაირი პირობები შეუქმნათ საკვლევ ობიექტებს და ცდომილება არ იყოს. შეფასებისას აღიწერება თათების ზედა ბილიკიდან ჩამოცდენათა რაოდენობა, რაც კოორდინაციისა და სივრცითი ორიენტაციის დარღვევაზე მიუთითებს.

§4.3 აჩქარებადი როტადორის ტესტი (Accelerating rotator)

აჩქარებადი როტადორი შედგება მბრუნავი ღეროსგან, რომელიც მოთავსებულია საკმარისად მაღლა, რათა ობიექტისათვის შეუძლებელი იყოს გადმოხტომა. ღერო დაყოფილა თანაბარად დაშორებულ ზონებად და აცალკევებს ცხოველს ერთმანეთისგან, რაც საშუალებას იძლევა ერთდროულად რამდენიმე ობიექტზე ჩაატარდეს ქცევითი კვლევა.

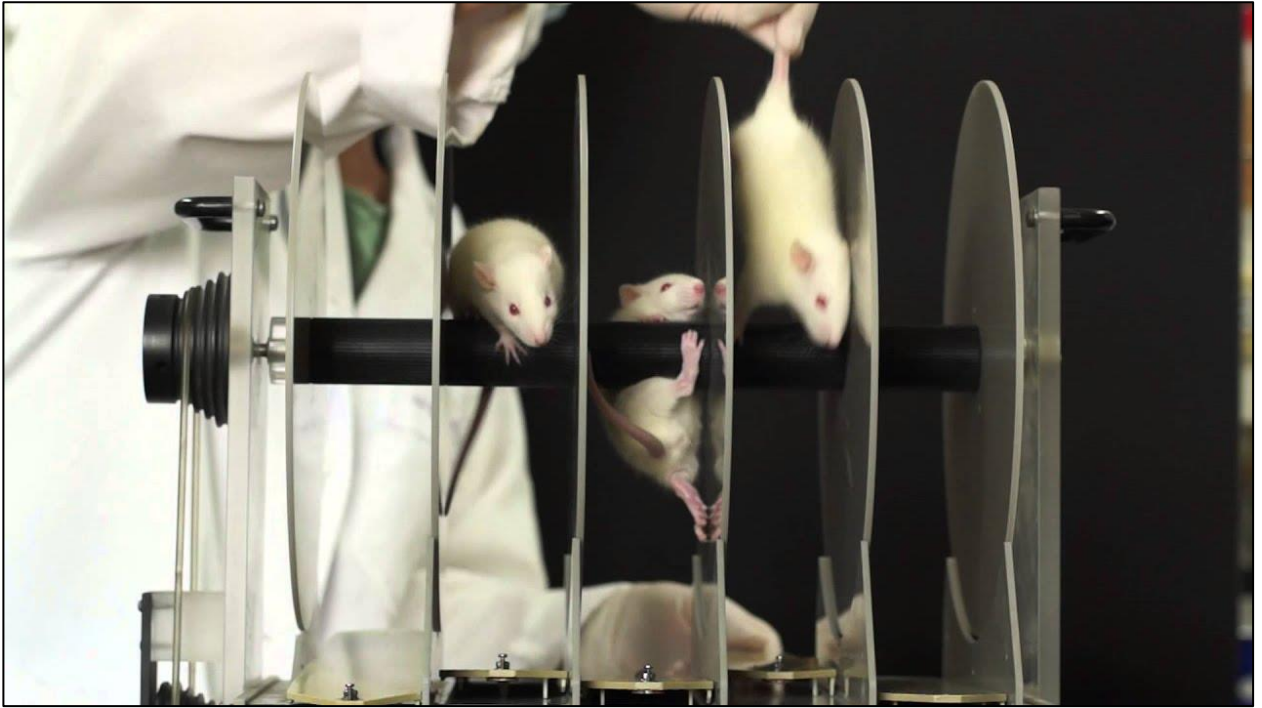
საჭირო დანადგარები:

- აჩქარებადი როტადორი
- კომპიუტერით კონტროლირებადი ავტომატური სისტემა (სურვილისამებრ)
- რაიმე რბილი საფენი, რომელიც დაიცავს ცხოველს დაზიანებებისაგან ჩამოვარდნის შემთხვევაში.

ეს ტესტი გამოიყენება მოტორული ბალანსის შესამოწმებლად, ასევე კოორდინაციული დეფიციტის ან/და მოტორული სწავლის უნარის შესაფასებლად. ცხოველი თავსდება წინასწარ გასუფთავებულ ღეროზე, რომელსაც შეუძლია აჩქარდეს 4-80 rpm -მდე. წრიული ღერო ტრიალებს მუდმივი ან მზარდი აჩქარებით (სურვილისამებრ). ტესტის ხანგრძლივობა 3-5 წუთს შეადგენს. ტესტი დასრულებულად ითვლება მას შემდეგ, რაც ცხოველი ჩამოვარდება ღეროდან ან მაქსიმალურ სიჩქარეზე შეძლებს გაჩერებას. ქცევის შეფასება ხდება მრავალჯერადი ტესტირების შემდეგ და რამდენიმე დღის განმავლობაში.

ქცევის შეფასება ხორციელდება შემდეგი კრიტერიუმებით:

- ღეროდან ჩამოვარდნა: ფასდება თუ რა დრო დაჟყო ცხოველმა ღეროზე. ეს მიუთითებს მოტორულ კოორდინაციისა და დასწავლის უნარზე.
- კუნთების სიძლიერე: რომლის შეფასებაც ხდება აჩქარების საშუალებით.



სურათი 9. აჩქარებადი როტადორი.

§4.4 ჯვარედინი ლაბირინთის ტესტი (Plus Maze)

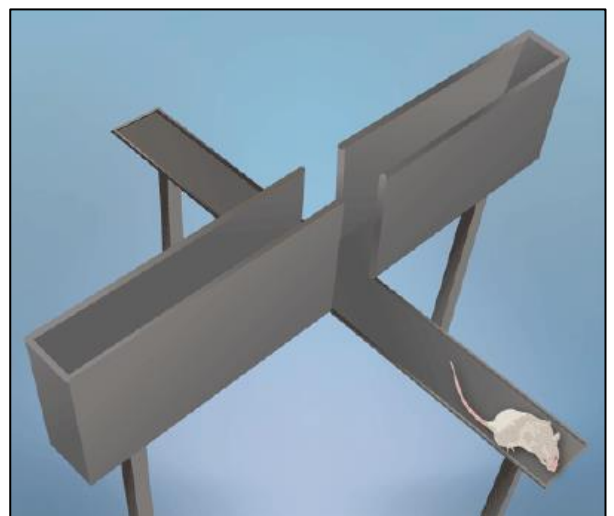
EPM -ის აპარატი შედგება ორი, პერპენდიკულარულად ურთიერთგადამკვეთი პლათფორმისგან, რომელთაგან ერთი არის დახურული კედლებით (სასურველია იყოს მუქი შეფერილობის და ზემოდან ღია, ხილვადობისთვის), ხოლო მეორე ღია. პლათფორმები მიწის ზედაპირიდან დაშორებულია 50-80სმ-ით და დგას ცილიდრული ფორმის საყრდენებზე.

საჭირო დანადგარები:

ჯვარედინი ლაბირინთი

- ღია პლათფორმის ზომებია : 25 x 5 x 0.5 სმ
- დახურული პლათფორმის ზომებია : 25 x 5 x 16 სმ
- პლათფორმის ცენტრის ზომებია : 5 x 5 x 0.5 სმ

ჯვარედინი ლაბირინთის ტესტი გამოიყენება შფოთვისთან დაკავშირებული ქცევის შესაფასებლად ცენტრალური ნერვული სისტემის დარღვევების მდრღნელების მოდელებში. ზოგჯერ ლაბირინთი აღრჭურვილია ინფრაწითელი ფოტოგადამცემებით, რომლებიც დაკავშირებულია კომპიუტერთან, რაც ამარტივებს შედეგების დათვლას ტესტირების შემდეგ (გამოიყენება Image EP -ის პროგრამას). ცხოველი თავსდება ცენტრში და 10 წუთის განმავლობაში ხდება დაკვირვება მისი გადაადგილების ტრაექტორიაზე, მოძრაობა არის თავისუფალი და არ ხორციელდება სტიმულაციები უმოძრაობის შემთხვევაში. ასევე დაკვირვება ხდება ისეთ ქცევებზე, როგორებიცაა: გაწეღვა, უმოძრაობა, უკანა თათებზე დგომა და ა.შ. ჯვარედინი ლაბირინთის ტესტი საკმაოდ მაღალვალიდურია, ვინაიდან ტესტი ეფუძნება მდრღნელების ბუნებრივ ზიზღს ღია სივრცეების მიმართ.



სურათი 10. ჯვარედინი ლაბირინთი.

ქცევის შეფასება :

1. შესვლების რაოდენობა ღია და დახურულ პლათფორმებში: აფასებენ რამდენჯერ განერიდა ცხოველი გამლიზიანებელს.
2. ღია და დახურულ პლათფორმებში გატარებული დრო : აფასებენ იმ დროს, რომელიც დაჰყო ობიექტმა გამლიზიანებლისგან თავის ასარიდებლად.
3. გაწელვა: აფასებენ, თუ რამდენჯერ წამოწია წინა კიდურები და შემდეგ უკან დაიხია საწყის მდგომარეობაში. მიუთითებს შფოთვის მაღალ დონეზე.
4. უკანა თათებზე დგომა: რამდენჯერ დადგა ცხოველი უკანა თათებზე, ეს ქცევა მიუთითებს გაზრდილ კვლევით ქცევაზე.

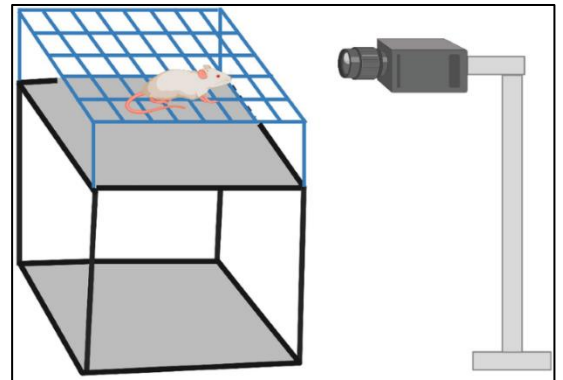
§4.5 ვერტიკალური საცერის ტესტი (Vertical screen test)

ვერტიკალური საცერი ქცევითი ტესტია, რომელიც გვაჩვენებს თავის ცოცვით აქტივობას. მისი შინაარსი შემდეგია: ჰორიზონტალურ პოზიციაში მყოფ სპეციალურ, კვადრატულ საცერის მაგვარ დანადგარზე თავსდება ობიექტი, რის შემდეგაც ხორციელდება აღნიშნული დანადგარის ვერტიკალურ პოზიციაში გადანაცვლება. დაიკვირვება თავის ცოცხვითი აქტივობა.

საჭირო დანადგარი:

ვერტიკალური საცერის დანადგარი

- a. კვადრატული ჩარჩო, ზომებით 15 x 15სმ
- b. ჩარჩოს შიგნით გაჭიმული მეტალის ბადე (საცერი), რომლის თითოეული კვადრატული დანაყოფის ზომაა 1 x 1სმ



სურათი 11. ვერტიკალური საცერი

ქცევის შეფასება :

1. შეფასებისათვის აღიწერება ავლენს თუ არა თავი ცოცვით აქტივობას
2. რამდენი დანაყოფი გაიარა თავგმა დროის გარკვეულ ერთეულში

§4.6 ამოტრიალებული საცერის ტესტი (Inverted screen test)

ამოტრიალებული საცერი თავის ფიზიკური მდგომარეობის შემაფასებელი ქცევითი ტესტია. მისი შინაარსი შემდეგია: მსგავსად ვერტიკალური საცერის ტესტისა, ამ შემთხვევაშიც, ობიექტი თავსდება ჰორიზონტალურ პოზიციაში მყოფ სპეციალურ, კვადრატულ საცერის მაგვარ დანადგარზე, რის შემდეგაც ხორციელდება აღნიშნული დანადგარის 180° -ით ამოტრიალება. აღიწერება დრო, რომელსაც თავი დაჰყოფს საცერზე ჩამოკიდებული. მნიშვნელოვანია, რომ პროცედურა ტარდებოდეს რბილი ზედაპირის ზედაპირზე, რათა არ მოხდეს ჩამოვარდნისას ცხოველის დაზიანება. საცერი განთავსებული უნდა იყოს ამ ზედაპირიდან, დაახლოებით 40-60სმ-ის სიმაღლეზე.

საჭირო დანადგარი:

ამოტრიალებული საცერის დანადგარი

- a. კვადრატული ჩარჩო, ზომებით 15 x 15სმ
- b. ჩარჩოს შიგნით გაჭიმული ბადე (საცერი), რომლის თითოეული კვადრატული დანაყოფის ზომაა 1 x 1სმ

ქცევის შეფასება :

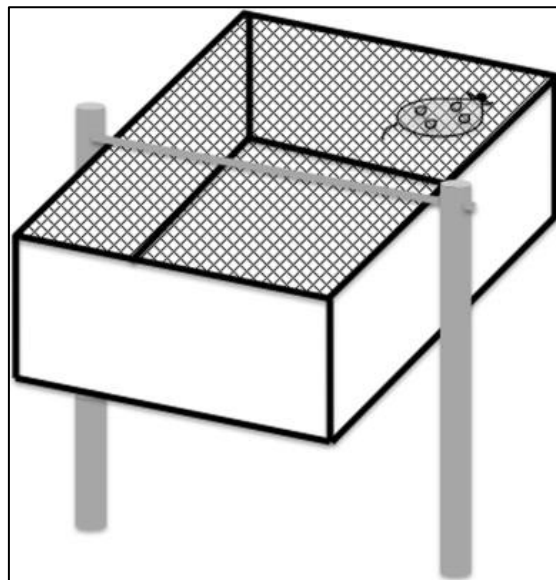
შეფასება ხდება იმ დროის შუალედით, რომელშიც მოხდა ცხოველის ვარდნა:

1-10წმ = 1 ქულა

11-25წმ = 2 ქულა

26-60წმ = 3 ქულა

60წმ = 4 ქულა



სურათი 12. ამოტრიალებული საცერი.

§4.7 წონის ტესტი (Weights test)

ე.წ. წონის ტესტი, რომელსაც ზოგჯერ თავის მძიმე ათლეტიკის ტესტსაც უწოდებენ, ეფუძნება თავის ბუნებრივ ლტოლვას კუდზე დაკიდებულ მდგომარეობაში ჩაეჭიდოს რაიმე ობიექტს. უფრო ზუსტად კი, ამ ტესტის ჩასატარებლად თავი უნდა აიყვანოთ კუდით და დასვათ ლაბორატორიულ მაგიდაზე ისე, რომ ობიექტმა შეძლოს მასზე განლაგებულ პირველ ტვირთს (20გ) ჩაჭიდება. ამის შემდგომ თავი კუდით უნდა ასწიოთ იქამდე, სანამ ტვირთი სრულად არ ასცილდება მაგიდას. აღნიშნულის ტვირთის 3წმ განმავლობაში დაჭერა წარმოადგენს კრიტერიუმს. მას შემდეგ რაც ყველა საცდელ ობიექტს გამოცდით პირველი ტვირთით, შესაძლოა გადასვლა მეორე ტვირთზე (ჭაჭვის ორი რგოლი) და ასე თანმიმდევრულად. აღნიშნული ტვირთი, როგორც წესი წარმოადგენს რაიმე მარტივად ჩაჭიდებად მსუბუქ ობიექტზე (წვრილი მავთულის გორგალი) დამაგდებულ ჯაჭვს, რომლის თითოეული რგოლი გარკვეული წონისაა (მაგ. 20გ).

საჭირო დანადგარი:

ტვირთი — ჯაჭვი, თანაბარი წონის რგოლებით

წვრილი მავთულის გორგალი

ქცევის შეფასება :

შეფასება ხდება შემდეგი ფორმულით:

$$(X \times 3) + Y$$



სურათი 13. წონის ტესტი

სადაც, X - ობიექტის მიერ აწეული რგოლების ის მაქსიმალური რაოდენობაა, რომელიც მან შეძლო აეწია სამი წამის განმავლობაში; Y - დრო (წმ), რომლის განმავლობაშიც ცხოველმა შესძლო მაქსიმალური რაოდენობის რგოლების აწევა. მაგალითად: თუ ობიექტმა შეძლო 3 რგოლის აწევა 3 წამის განმავლობაში და 4 რგოლისა 1 წამის განმავლობაში, მისი შეფასებაა $(3 \times 3) + 1 = 10$

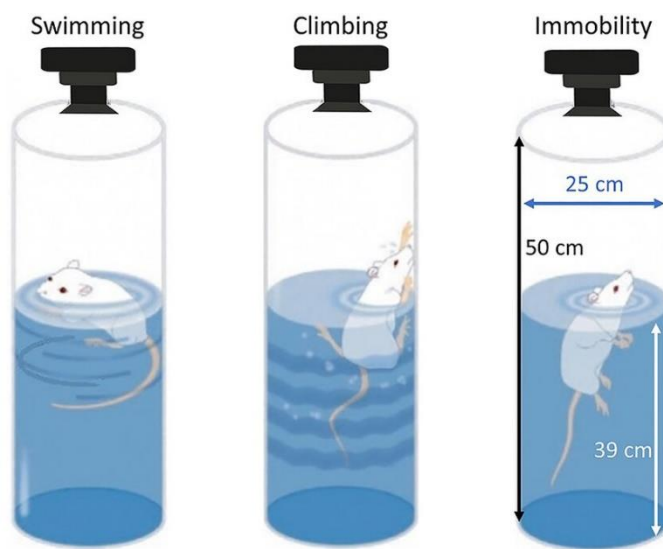
სიმარტივისათვის არსებობს მისი ელექტრონული ვარიანტიც, რომელიც ავტომატურად აღრიცხავს თავის ძალისხმევას.



სურათი 14. ელექტრონული წონის ტესტი

§4.8 იძულებითი ცურვის ტესტი (Forced swim test)

იძულებითი ცურვის ტესტის ჩასატარებლად საჭიროა წყლის ცილინდრული ფორმის, პლექსიგლასისაგან (დასაშვებია მინაც) დამზადებული ავზები. ავზების ზომები ისე უნდა შეირჩეს, რომ ცურვის ტესტის დროს ცხოველი ვერ შეეხო ფსკერს როგორც თათით ასევე კუდიტ. სიმაღლის განსაზღვრისას გასათვალისწინებელია ისიც, რომ ცხოველმა ვერ უნდა შეძლოს ავზიდან ამოძრომა. დანადგარის დიამეტრი და წყლის დონე მნიშვნელოვანი პარამეტრებია, რომელთა კორექტირებამაც შესაძლებელია თავგების ქცევის შეცვლა გამოიწვიოს.



სურათი 15. იძულებითი ცურვის ტესტი

საჭირო დანადგარები:

ავზი, ზომებით: 30 სმ(სიმაღლე) x 20 სმ
დიამეტრი (წყლის დონე 15 სმ)

თერმომეტრი: წყლის ტემპერატურა ერთ - ერთი მნიშვნელოვანი პარამეტრია, რომელიც 23 – 25 °C ფარგლებში უნდა მერყეობდეს.

წამოზომი

ვიდეო კამერა: იმის გამო, რომ ხშირად იძულებითი ცურვის ტესტის ჩატარება ხდება რამდენიმე ცხოველზე ერთდროულად, ინდივიდუალურად დათვლილი მონაცემები არ არის ვალიდური. ვიდეოჩანაწერი კი ამ პრობლემას ჭრის და მონაცემთა დათვლაც მარტივდება.

ავზების გამოყოფი: ზომებით – 35 სმ (სიმაღლე) x 22 სმ (სიგრძე) x 22 სმ (სიგანე). მართკუთხა ფორმის სამი კედლით, რომელიც თავსდება ავზის უკან და გვერდით, ხოლო წინა ნაწილი კი რჩება ღია. ეს ხელს უშლის თავგებს ერთმანეთზე ზემოქმედებისაგან. თეთრი თავგების გამოყენების შემთხვევაში გამოყოფი შავი ფერისაა, ხოლო შავი თავგების გამოყენებისას — თეთრი ან კრემისფერი.

თეთრი ხმაურის გენერატორი: ეს საჭიროა ლაბორატორიულ გარემოში, რათა მოვახდინოთ იმ დამატებითი ხმების ეფექტის პრევენცია, რომლებიც პოტენციურად შემაშფოთებელია თავგებისთვის.

პირსახოცი: აუცილებელია ცხოველის გალიაში დაბრუნებამდე გამშრალება.

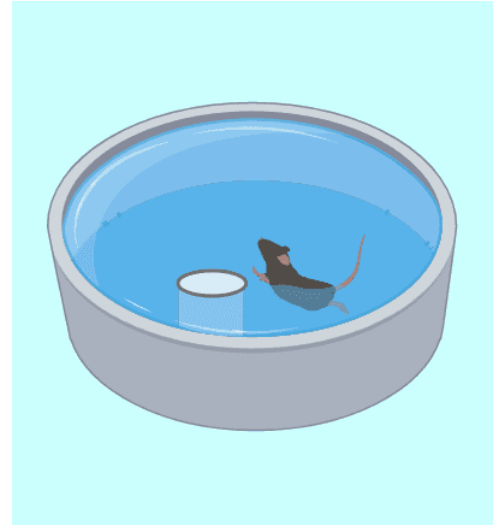
სასურველია გამოვიყენოთ ავზების ის რაოდენობა, რამდენი საკვლევი ობიექტის ჯგუფიც გვყავს. ტესტის დაწყებამდე ცხოველები უნდა მოთავსდეს კვლევის ოთახში და აკლიმატიზაციისთვის დავაყოვნოთ იქ 60 წუთი. ცხოველები ინდივიდუალურად, ან ორ - ორად უნდა მოვათავსოთ ავზებში და მოვამზადოთ კამერა. ტესტის ხანგრძლივობა საშუალოდ 6 წუთია, თუმცა ხშირად არ აღემატება 4 წუთს. იმავე მიმდევრობით, როგორც ჩასვით, ამოიყვანეთ ცხოველები ავზებიდან და გაამშრალეთ. ტესტის დასრულების შემდეგ მკაცრად რეკომენდირებულია ავზის დაცლა და თავიდან შევსება შემდეგი ტესტირებისათვის.

ქცევის შეფასება :

იძულებითი ცურვის ტესტის დროს ფასდება თავგის დეპრესიული ფონი, რომელიც განისაზღვრება უმოძრაობით. შედეგების დათვლა ხდება კომპიუტერულად შემდეგნაირად: ტესტის ხანგრძლივობის დროს (რომელიც საშუალოდ = 240) აკლდება დროის იმ მონაკვეთთა ჯამი, რომლის დროსაც თავგი იყო აქტიური.

§4.9 მორისის წყლის ლაბირინთის ტესტი (Morris water maze test)

მორისის წყლის ლაბირინთი საკმაოდ ინფორმატიული ქცევითი ტესტია. მისთვის განკუთვნილი დანადგარის ზომები თავდაპირველად იყო 50სმ (სიმაღლე) x 130სმ (დiameter), მაგრამ მოგვიანებით დiameterის ზომა შეიცვალა და დღესდღეობით იგი 120-220 სმ diameterის მქონე წრიულ ავზს წარმოადგენს. ლაბირინთს აქვს ორი ვარიანტი, ერთი მათგანი ვირთაგვებისათვისაა განკუთვნილი, ხოლო მეორე — თავგებისთვის. ორივე მათგანი არის უჟანგავი ფოლადისგან დამზადებული. ვირთაგვისთვის განკუთვნილი ლაბირინთი, როგორც წესი წარმოდგენილია 210სმ diameterით, ხოლო თავგებისა — 122სმ-ით. იმ შემთხვევაში, თუ გამოყენებულია ალბინოსი თავგები ან / და ვირთაგვები, ავზი შეღებულია შავად. ავზში მოთავსებული კვადრატული პლატფორმა ჩვეულებრივ არის ან კვადრატული (ფართობით 10-11სმ²) ან ცილინდრული (diameterით 10-12სმ). იგი, როგორც წესი ჩადირებულია ზედაპირიდან 1-2 სმ-ით (თავგებთან ეს მონაცემი მცირდება 0.5-1 სმ -მდე).



სურათი 16. მორისის წყლის ლაბირინთი

საჭირო დანადგარები:

წამშომი

თერმომეტრი: ტემპერატურის კონტროლისათვის, რომელიც უნდა ვარიერებდეს 19°C -დან 22°C -მდე.

პირსახოცი: გასამშრალეზად გალიაში მოთავსებამდე.

ვიდეო კამერა: ტრაექტორიის განსაზღვრისათვის, შემდგომი გამოთვლებისთვის.

მორისის წყლის ლაბირინთი ნეირომეცნიერებაში ერთ-ერთი ყველაზე ფართოდ გამოყენებადი ტესტია, სივრცითი ორიენტაციის დასწავლის, მეხსიერების ფსიქოლოგიური პროცესებისა და ნერვული მექანიზმების შესასწავლად. ცხოველი თავსდება ავზში, რის შემდგომაც ირთვება ტაიმერი ან სათვალთვალო სისტემა და ხორციელდება დაკვირვება 60 წამის განმავლობაში (ვირთაგვების შემთხვევაში 120 წამი) ან მანამ, სანამ პლატფორმასთან მივა ობიექტი. პირველ ცდაზე ცხოველი იქნება ავზის კიდესთან და შეეცდება გაქცევას, 60 წამის გასვლის შემდეგ, მანიპულაციებით უნდა მივუთითოთ ცხოველს პლატფორმისკენ, რომ მასზე ავიდეს ან მანიპულაციების უშედეგობის შემთხვევაში პირდაპირ მოვათავსოთ მასზე და დავტოვოთ 30 - 15 წამის განმავლობაში. ამ დროს პლატფორმა წყლის ზედაპირიდან 1 სმ-ითაა ამოწეული. ამის შემდგომ ცხოველი უნდა ამოვიყვანოთ, გავამშრალოთ და დავაბრუნოთ გალიაში. შემოაღწერილი პროცედურა უნდა გამეორდეს მომდევნო დღეებშიც. დღეების რაოდენობა დამოკიდებულია სწავლის მრუდზე. საშუალოდ დღეში ოთხი ცდა, 5-6 დღის განმავლობაში (ანუ ჯამში 20 - 24 ცდა) ითვლება ოპტიმალურად. ამის შემდეგ ამოიღეთ პლატფორმა, მოათავსეთ ცხოველი პლატფორმის თავდაპირველი პოზიციიდან 180° შებრუნებით (სივრცითი მეხსიერების შესაფასებლად). პლატფორმის ამოღების მიზანია იმის დადგენა, ახსოვს თუ არა ცხოველს სად მდებარეობდა იგი.

ქცევის შეფასება :

1. პლატფორმის ადგილის გადაკვეთის რაოდენობა
2. სამიზნე კვადრატში გატარებული დრო

§4.10 პასიური განრიდების ტესტი (Passive avoidance test)

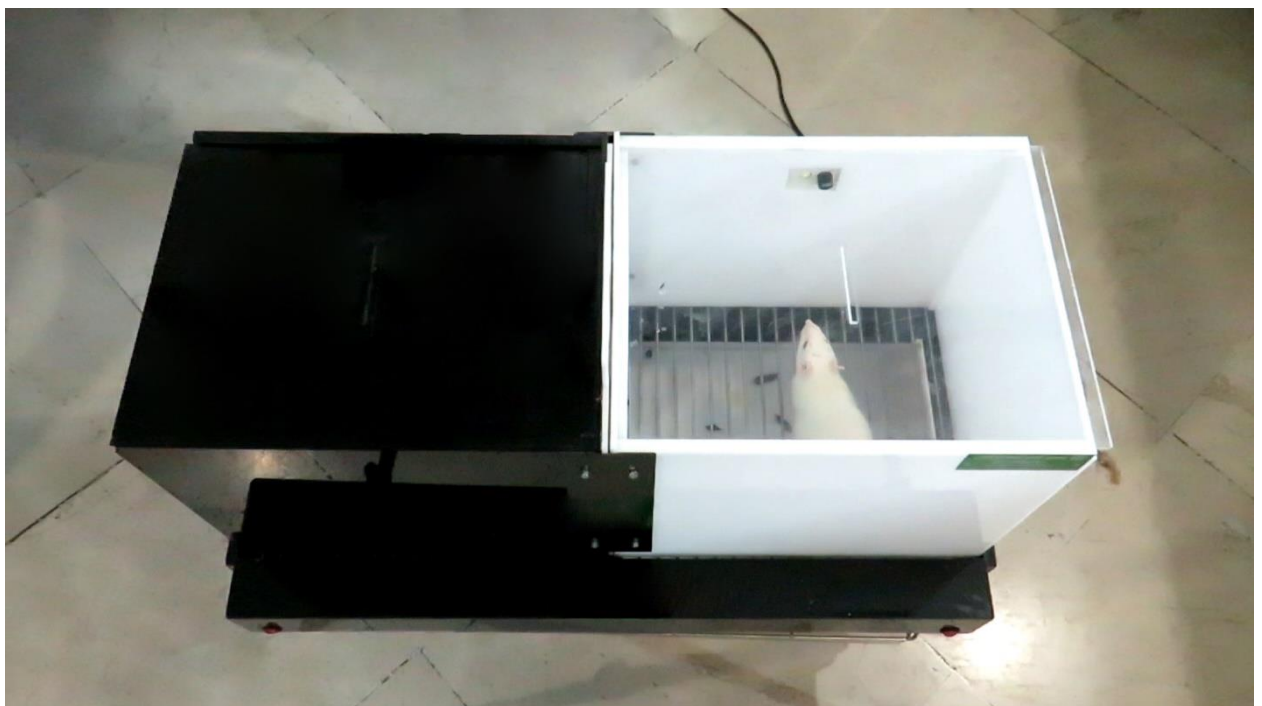
პასიური განრიდება მეხსიერების შესწავლისას, ერთ-ერთი ყველაზე საინტერესო და ინფორმატიული ტესტია. იგი გვაძლევს საშუალებას შევაფასოთ ცხოველის საბაზისო დასწავლის უნარები, ელექტრული შოკით სტიმულაციის გზით. ცხადია, აღნიშნული სტიმული უნდა იყოს მინიმალური (0.2-0.5mA) და ხანმოკლე (1-2 წამი). ამასთან, ის ცხოველები, რომლებსაც აღენიშნებათ რაიმე ფიზიკური დარღვევა, მათ შორის ჰიპერალგეზია, უნდა გამოირიცხონ ექსპერიმენტული ჯგუფიდან.

საჭირო დანადგარები:

პასიური განრიდების აპარატი: ორი ერთნაირი ზომის კამერით (17 x 12 x 10სმ), რომელთაგან ერთ-ერთი განათებულია, მეორე კი ბნელი. ბნელი კამერის ძირი წარმოადგენს მეტალის ბადეს, რომელიც ატარებს დენს და მიერთებულია ელექტროგენერატორს. აღნიშნულ ორ სივრცეს ყოფს მოძრავი გილიოტინის მაგვარი კარი.

ელექტროშოკის გენერატორი

ცხოველს ათავსებენ განათებულ კამერაში, ალებენ გამყოფ კარს, რის შემდეგაც, გამომდინარე მისი განათებისადმი ბუნებრივი ზიზღისა გადაინაცვლებს ბნელ კამერაში. ამასთან, ხდება დაყოვნების დროის აღწერა., ანუ იმ დროისა რაც კარის გაღების შემდგომ დაჰყო ცხოველმა განათებულ კამერაში. ამის შემდგომ ბნელი კამერის კარი იკეტება, ხორციელდება მცირე ელექტროშოკური სტიმულაცია 1-2 წამის განმავლობაში, რის შემდგომაც ცხოველი აღნიშნულ კამერაში ჩერდება დამატებით 10 წამის განმავლობაში. ეს წარმოადგენს ე.წ. ტრეინინგს. ტრეინინგიდან 1-7 დღის შემდგომ, ტარდება ცდა. ამ დროს, ცხოველს კვლავ ათავსებენ განათებულ კამერაში, ალებენ კარს და აღრიცხავენ შესვლამდე დაყოვნების დროს. თუმცა ამჯერად შესვლის შემდგომ, ელექტროსტიმულაცია აღარ ხორციელდება. ხდება დროის ამ ორი მონაცემის შედარებითი ანალიზი.



სურათი 17. პასიური განრიდების კამერა

§4.11 კუდიტ დაკიდების ტესტი (Tail Suspension Test)

კუდიტ დაკიდების ტესტი არის თავისი ქცევის პარადიგმა, რომელიც ზომავს სასოწარკვეთილ, ანუ „დეპრესიის მსგავს“ ქცევას და დასწავლილ უძწეობას. ის სასარგებლოა პოტენციური ანტიდეპრესანტების სკრინინგისთვის და სხვა მანიპულაციების შესაფასებლად, რომლებიც, მოსალოდნელია გავლენას მოახდენენ დეპრესიასთან დაკავშირებულ ქცევებზე. აღნიშნული ტესტი ტარდება პატარა კამერაში, რომელშიც თავგები კუდიტ არიან დაკიდებული კამერის „ჭერზე“ დაფიქსირებულ ძელზე ჩამოკიდებულ კაუჭებზე. ისეთ მდგომარეობაში, რომ მათ არ შეუძლიათ გაქცევა ახლომდებარე ზედაპირებზე; მისი უპირველესი საზომია უმოძრაობა. კუდიტ დაფიქსირება ხდება წებოვანი ლენტის დახმარებით, რომელიც საკმაოდ ძლიერი უნდა იყოს, რათა თავი არ ჩამოვარდეს, თუმცა ამავედროულად არ უნდა დააზიანოს ცხოველი. ტესტი გრძელდება 6 წუთი, უმოძრაობის დრო ჩვეულებრივ იზომება ბოლო 4 წუთის განმავლობაში, ვინაიდან თითქმის ყველა თავი ცდილობს გაქცევას პირველი 2 წუთის განმავლობაში. უმოძრაობის დრო (ანუ დრო, როცა ცხოველი პასიურად და უმოძრაოდ არის ჩამოკიდებული) იზომება თითოეული ცხოველისთვის და განიხილება „დეპრესიის მსგავსი“ ქცევის ინდექსად.

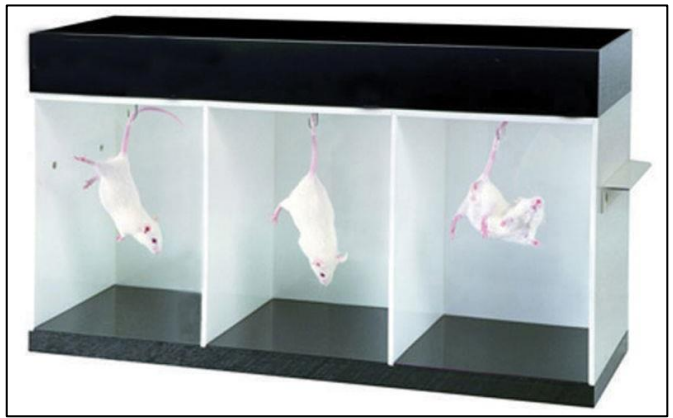
საჭირო დანადგარები:

კუდით დასაკიდებელი კამერა
ჰორიზონტალურად დაფიქსირებული ძელით

არაბასრი კაუჭები

ექვევის შეფასება :

უმოდრად ჩამოკიდების დრო, ბოლო 4
წუთის განმავლობაში



სურათი 18. კუდით დაკიდების დანადგარი

ნაწილი II

ბიოქიმიური კვლევის მეთოდები

თავი V

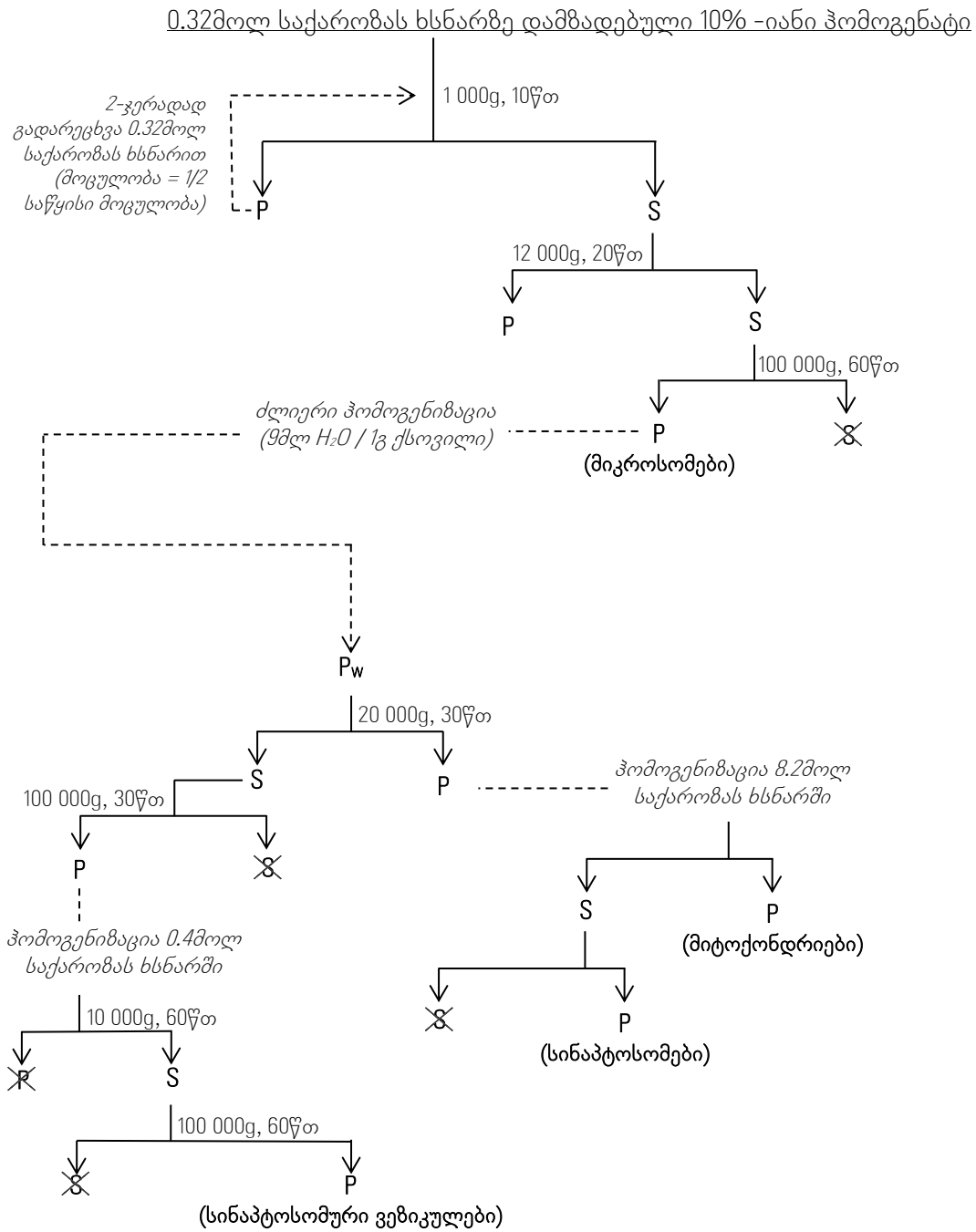
სუბუჯრედული ფრაქციონირების მეთოდები

ორგანიზმის, და საკუთრივ თავის ტვინის მოლეკულური დონეზე შესწავლა ხშირ შემთხვევაში საჭიროებს უჯრედის გარკვეული სტრუქტურების იზოლაციას, რაც ზოგჯერ არც თუ მარტივია. აღნიშნული რეზულტატის მისაღწევად, როგორც წესი იყენებენ ცენტრიფუგირების მეთოდს. ცენტრიფუგა — სპეციალური მოწყობილობაა, რომელიც ცენტრიდანული ძალების მოქმედებით მექანიკურად ყოფს ნარევს შემადგენელ ნაწილებად. მოლეკულურ ფსიქიატრიაში აღნიშნულ ნარევს უხშირესად თავის ტვინის ჰომოგენატი წარმოადგენს. მაშასადამე ცენტრიფუგირებამდე, სუბუჯრედული ფრაქციონირებისათვის საჭირო პირველ პროცედურას წარმოადგენს ჰომოგენიზირება, რაც ბერძნულ-ლიდან თარგმანში, სიტყვა-სიტყვით გაერთვაროვნებას ნიშნავს. ჰომოგენიზაციისათვის გამოიყენება სპეციალური ხელსაწყო — ჰომოგენიზატორი, რომელიც თავისმხრივ შესაძლოა იყოს რამდენიმე სახის: (1) მექანიკური (მაგ. პოტერის, დაუნსის და ა.შ.); (2) ულტრაბგერითი და (3) მაღალი წნევის. ჰომოგენიზაციისას, როგორც წესი გამოიყენება სპეციალური ბუფერები, რომელთა ბუნებაც დამოკიდებულია მეთოდსა და სასურველ შედეგზე. მას შემდეგ, რაც ქსოვილი ერთგვაროვან მასად იქცა შესაძლოა ცენტრიფუგირება. გამოყოფენ მრავალი ტიპის ცენტრიფუგას, რომელთა კლასიფიკაციაც, ყველაზე ხშირად სიჩქარით ხდება და განიხილავ: (1) დაბალი სიჩქარის (2) მაღალი სიჩქარისა და (3) ულტრაცენტრიფუგები. თუმცა იქამდე, სანამ ცენტრიფუგების სიჩქარეზე ვისაუბრებდეთ, საჭიროა განვსაზღვროთ ამ სიჩქარის ერთეული. ცენტრიფუგირების სიჩქარის ერთეულად მიჩნეულია ორი სიდიდე ე.წ. RCF (Relative Centrifugal Force) და RPM (ინგლ. Revolutions per minute of rotor) ერთეულები. ამასთან $RCF = 1.12 \times \text{Radius} \times (\text{rpm}/1000)^2$. მაშასადამე, დაბალი სიჩქარის ცენტრიფუგებს მიეკუთვნებიან ისინი, რომელთა სიჩქარეც არ აღემატება 10 000RPM -ს; მაღალი სიჩქარის ცენტრიფუგების სიჩქარე მერყეობს 10 000 - 30 000 RPM შორის; ხოლო ულტრაცენტრიფუგების სიჩქარე აღემატება 30 000RPM -ს. ყურადსაღებია ცენტრიფუგათა შორის კიდევ ერთი სხვაობა, სახელდობრ არსებობენ მაცივრიანი და უმაცივრო ცენტრიფუგები რაც ასევე მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ბიოქიმიურ კვლევებში. მიუხედავად ზემოხსენებული ფაქტორების დიდი მნიშვნელობისა ცენტრიფუგის ფუნქციონირებაში ცენტრალურ როლს ასრულებს როტორი, რომელიც შესაძლოა იყოს: (1) ვერტიკალური, (2) ჰორიზონტალური ან (3) ფიქსირებულ-კუთხოვანი. აღნიშნული როტორები შესაძლოა გათვლილი იყოს სხვადასხვა ტიპის სინჯარებზე ან პლანშეტზე.

§5.1 სუბუჯრედული ფრაქციონირების მიღება დე-რობერტისის მეთოდით

სუბუჯრედული ფრაქციონირების მიღების მეთოდი, რომელიც De Robertis და თანაავტორებმა შეიმუშავეს (De Robertis et al., 1962), სუბუჯრედული ფრაქციონირების მიღების გავრცელებული მეთოდია. იგი გულისხმობს ეტაპობრივ ცენტრიფუგირებას, რომლის შედეგადაც შეგვიძლია მივიღოთ: მიკროსომები, მიტოქონდრიები, სინაპტოსომები და სინაპტოსომური ვეზიკულები. დეტალურად ეს მეთოდი წარმოდგენილია სქემაზე.

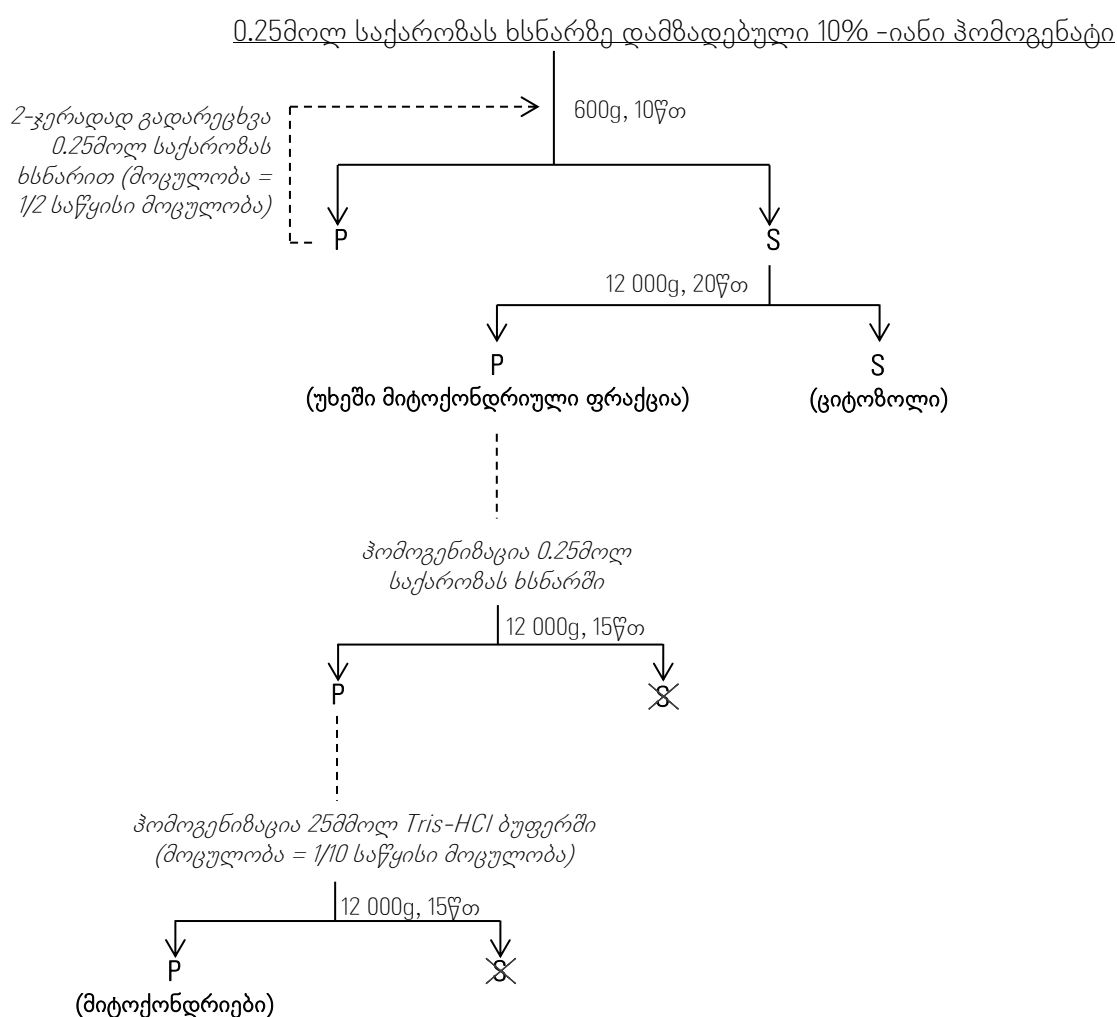
სუბუჯრედული ფრაქციების მიღების სქემა დე-რობერტსის მეთოდით



§5.2 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება შნაიდერის მეთოდით

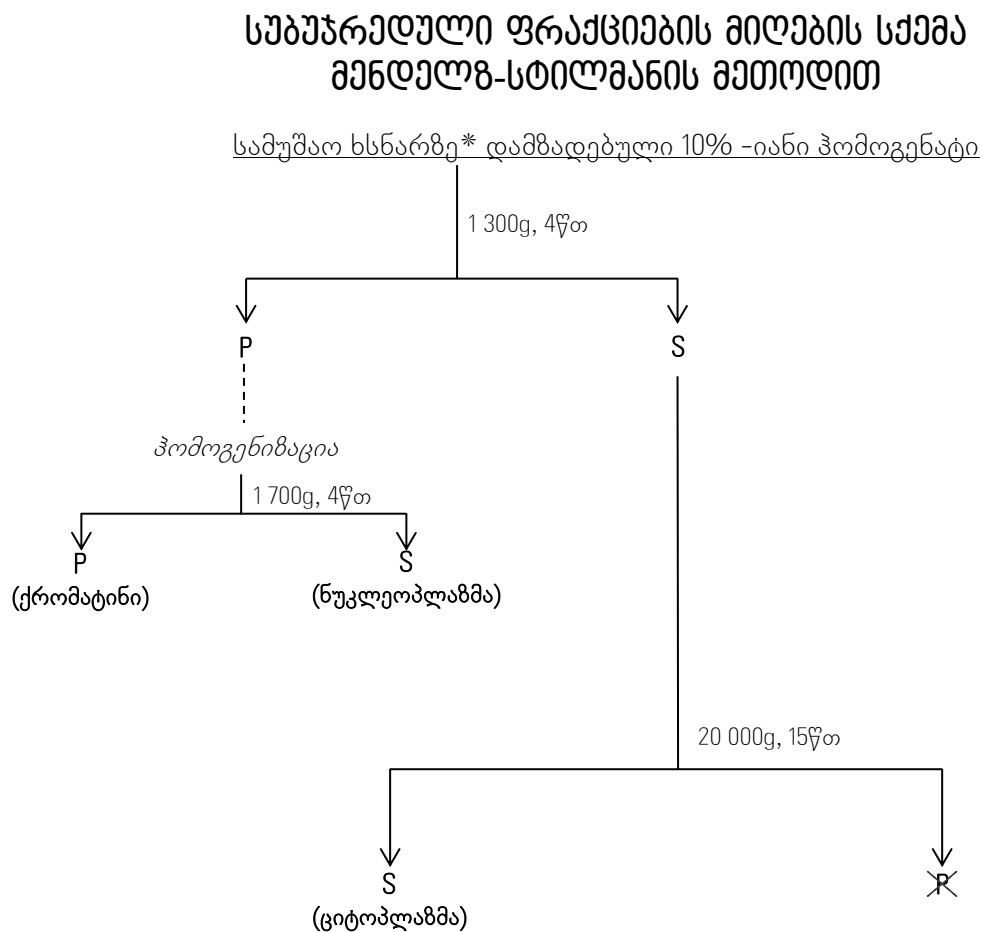
სუბუჯრედული ფრაქციების მიღების კიდევ ერთ ცნობილ მეთოდს წარმოადგენს შნაიდერის მიერ შემუშავებული ცენტრიფუგირების სქემა, რომელიც ქვევითაა წარმოდგენილი. აღნიშნული მეთოდი საშუალებას იძლევა მივიღოთ უხეში და სუფთა მიტოქონდრიული ფრაქციები, ასევე ციტოზოლური ფრაქცია.

სუბუჯრედული ფრაქციების მიღების სქემა შნაიდერის მეთოდით



§5.3 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება მენდელზ-სტილმანის მეთოდით

ფრაქციონირება მენდელზ-სტილმანის მიხედვით საშუალებას გვაძლევს გამოვყოთ ქრომატინი და ნუკლეოპლაზმა. ასევე ციტოპლაზმა (Méndez J., et al., 2000). აღნიშნული მეთოდი მეტად პრაქტიკულია კვლევებისას მოლეკულურ ბიოლოგიაში.

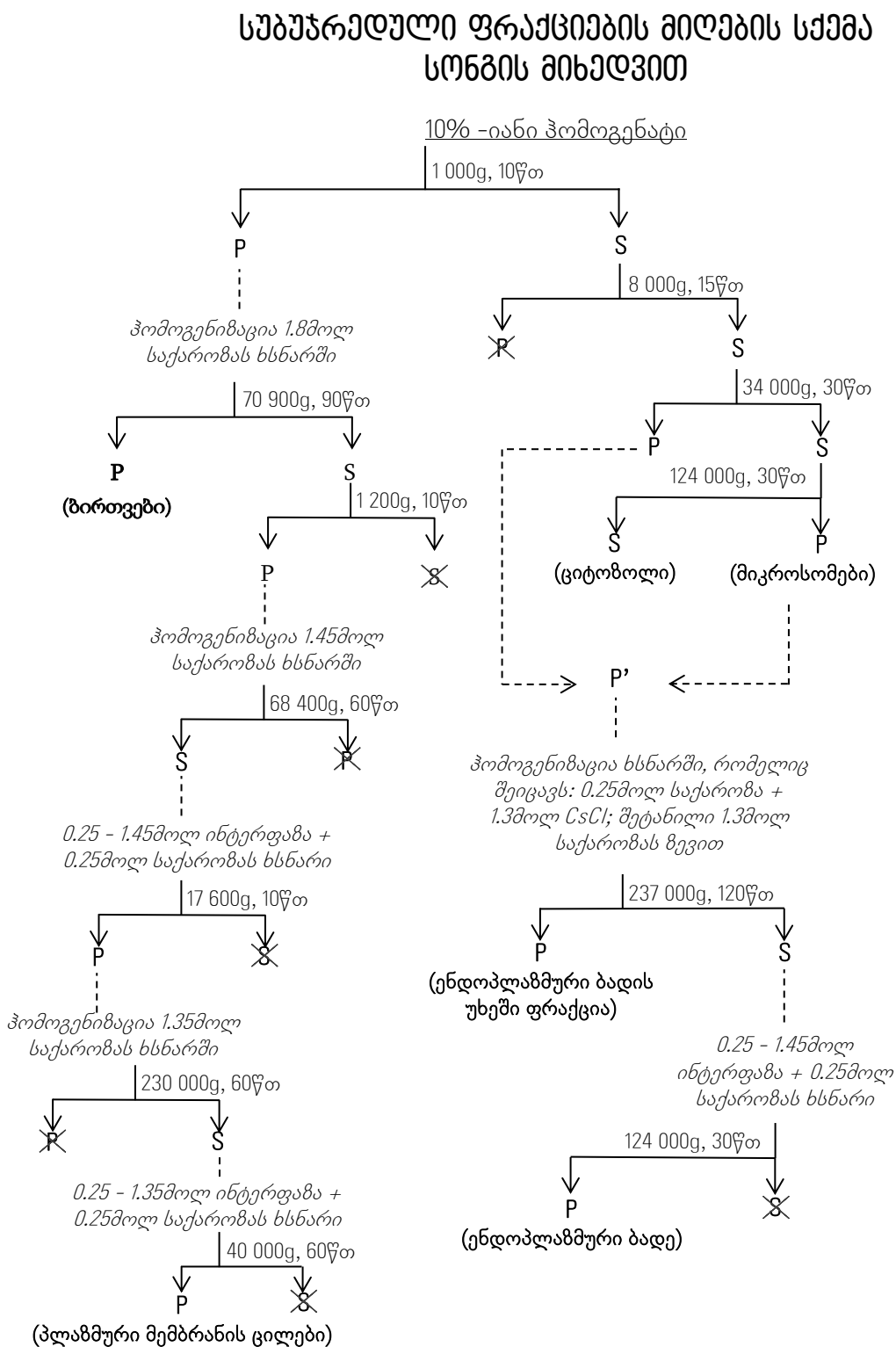


* სამუშაო ხსნარის შემცველობა:

0.34მოლ საქაროზა + 10% გლიცეროლი + 0.1% ტრიტონ X-100

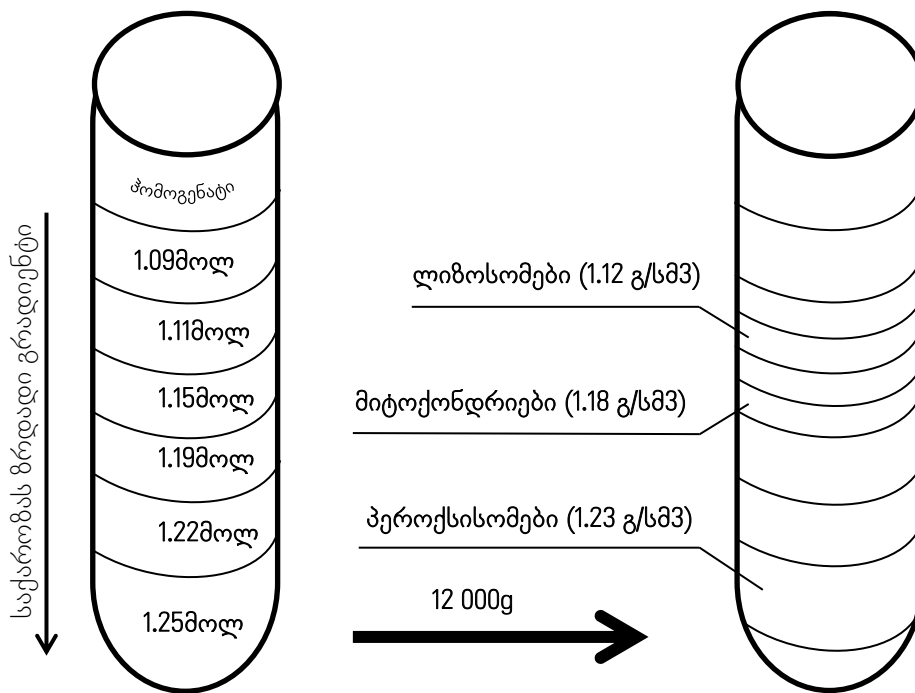
§5.4 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება სონგის მეთოდით

ერთ-ერთ ყველაზე მრავალფუნქციურ მეთოდს სუბუჯრედული ფრაქციონირებისა, წარმოადგენს სონგის მეთოდი (Song, Y et al., 2006). ეს მეთოდი მოსახერხებელია იმდენად, რამდენადაც საშუალებას გვაძლევს გამოვყოთ მრავალინ სუბუჯრედული ერთეული, როგორებიცაა: ბირთვები, ციტოზოლი, მიკროსომული ფრაქცია, ასევე ენდოპლამზური ბადე და პლამზური მემბრანის ცილების ფრაქცია.



§5.5 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება გრადიენტული ცენტრიფუგირების მეთოდით

ზოგჯერ, როდესაც ამის საშუალებას იძლევა მასალის რაოდენობა, მეტად მოსახერხებელია არა საფეხურობრივი არამედ ე.წ. გრადიენტული ფრაქციონირების მეთოდები, როდესაც ერთჯერადი ცენტრიფუგირებით ვიღებთ სხვადასხვა სუბუჯრედულ ფრაქციას, მათი სიმკვრივის მიხედვით. ამის მაგალითი წარმოდგენილია ქვევით სქემაზე, სადაც გამოყენებულია ე.წ. საქარობას გრადიენტი, ანუ სხვადასხვა მოლარობის საქარობა ისხმევა ცენტრიფუგის სინჯარაში თანმიმდევრულად, რის შემდეგაც ემატება ჰომოგენატი და ცენტრიფუგირდება.



სურათზე აღწერილია სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება საქარობას გრადიენტში. მარცხენა სინჯარაზე მოცემულია საქარობას ხსნარის მოლური კონცენტრაციები შესაბამისი თანმიმდევრობით.

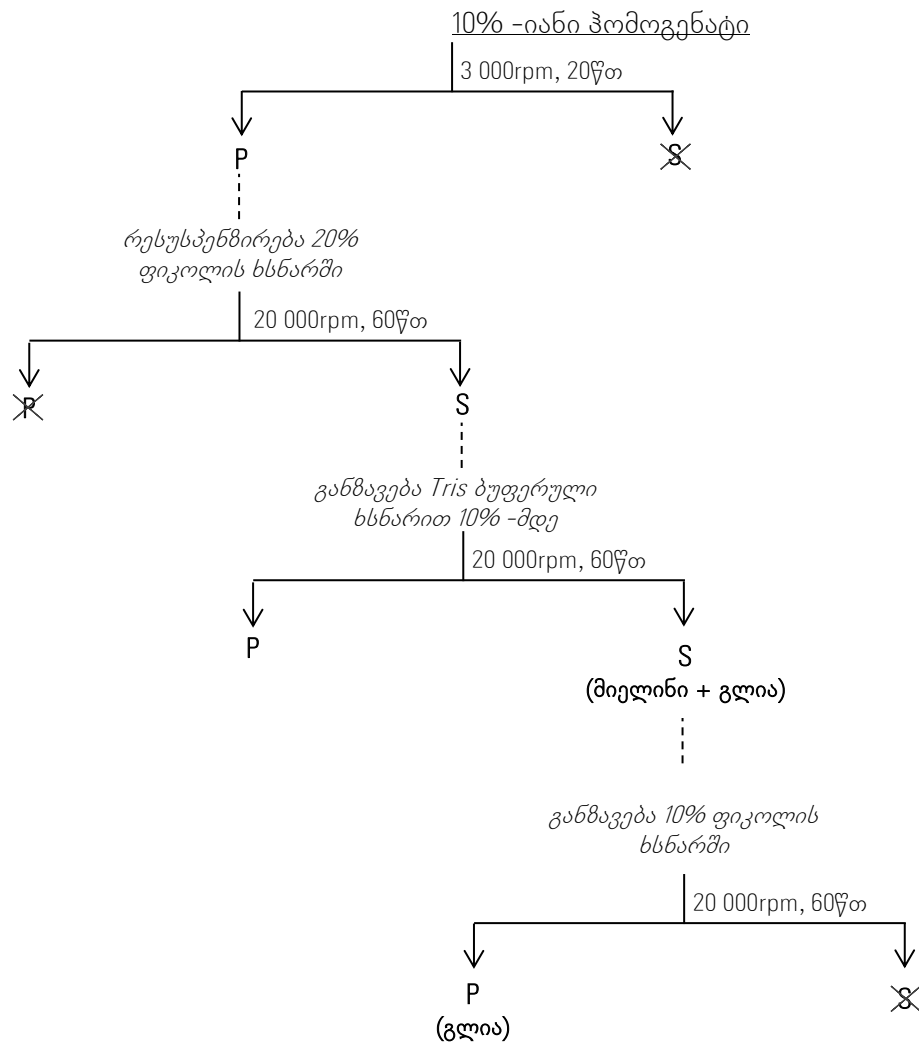
§5.6 გოლჯის კომპლექსის გამოყოფის მეთოდი ჩენის მიხედვით

გოლჯის კომპლექსის გამოყოფისათვის გამოიყენება ჩენის მიერ შემუშავებული მეთოდი (Chen X., et al., 2012). ეს მეთოდი გულისხმობს საქარობას ე.წ. სენდვიჩის პრინციპით ცენტრიფუგირებას. ამისათვის, სინჯარაში თანმიმდევრობით შეგვაქვს 0.85მოლ საქარობას ხსნარი + 0.5მოლ საქარობას ხსნარზე დამზადებული 10%-იანი ჰომოგენატი + 0.25მოლ საქარობას ხსნარი. აღნიშნული ცენტრიფუგირდება 103 800g, 60 წუთი. სასურველ ფრაქციას ვიღებთ საქარობას გრადიენტის 0.5 - 1.3მოლ შუალედში.

§5.7 გლიური უჯრედების გამოყოფა ფიქსირებული როტორით

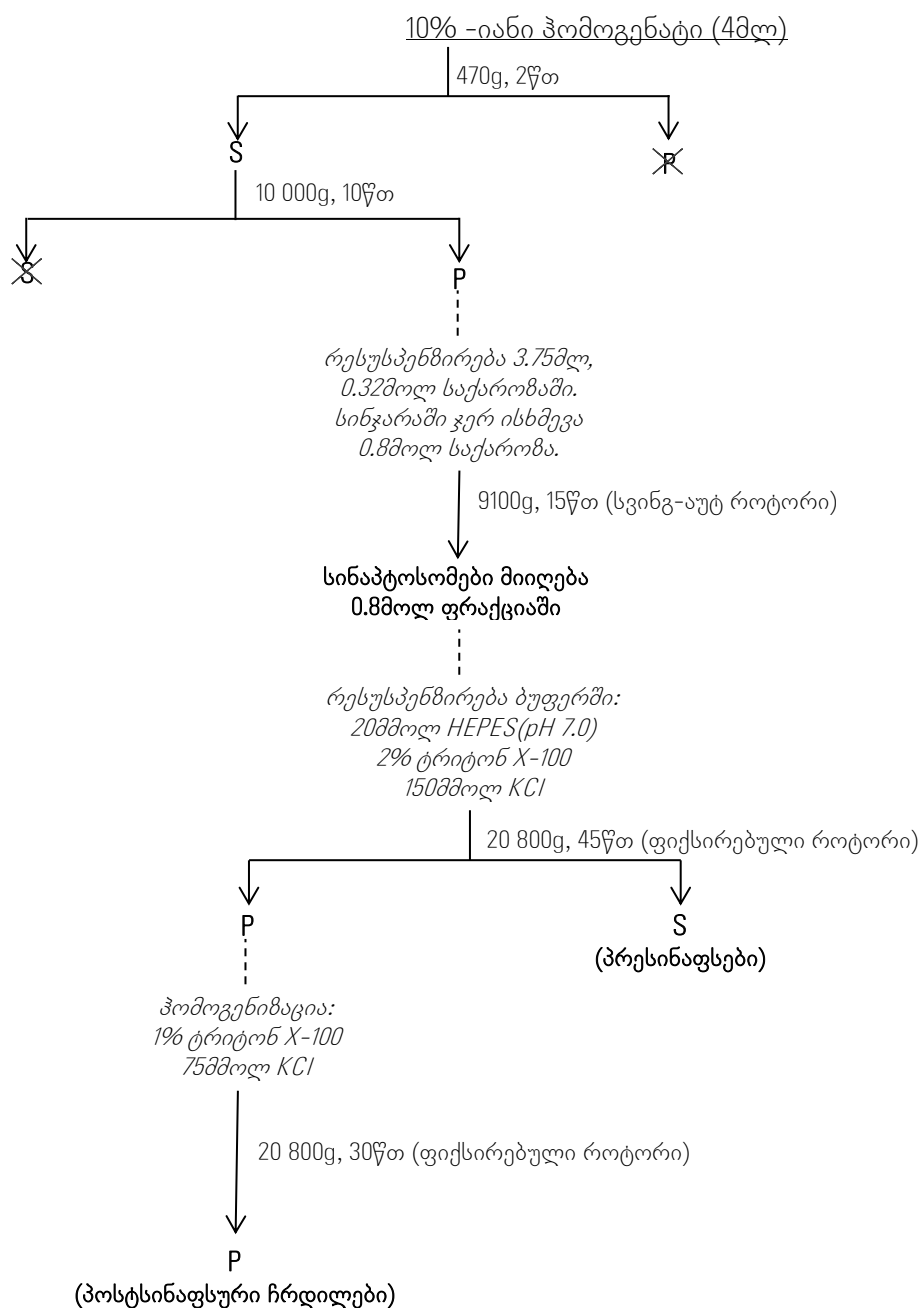
გლიური უჯრედების მიღება სხვადასხვა მეთოდითაა შესაძლებელი. მაგალითად არსებობს რამდენიმე კლასიკური მეთოდი, რომელიც საჭიროებს ე.წ. სვინგ-აუთ ტიპის როტორსა და ულტრაცენტრიფუგას. ეს ყოველთვის ხელმისაწვდომი არაა მკვლევართათვის, ამიტომ ჩვენ ქვევით წარმოვადგინეთ სქემა, თუ როგორ შეიძლება მივიღოთ გლიური ფრაქცია ფიქსირებული როტორისა და ე.წ. საშუალო სიმძლავრის ცენტრიფუგის (მაქსიმალური სიჩქარე 20 000g) საშუალებით.

ბლიური უჯრედების გამოყოფა ფიქსირებული როტორით



§5.8 პრე- და პოსტ-სინაფსური ფრაქციების მიღება

ბუნებრივია ნეიროქიმიურ კვლევებში, განსაკუთრებით კი მოლეკულური ფსიქიატრიის დარგში უმნიშვნელოვანესი როლი ენიჭება სინაფსების შესწავლას. ამისათვის კი ხშირად საჭიროა, როგორც სინაპტოსომური ფრაქციის მიღება, ისე განცალკავებულად პრე და პოსტ სინაფსების ფრაქციონირება. ამ მიზნით მოსახერხებელია შენისა და ჩენის მეთოდის გამოყენება (Shen, C., and Chen, Y., 2013)



თავი VI

ცილების შესწავლის მეთოდები

ცილები, უჯრედის მაკრომოლეკულების ყველაზე დიდი კლასია. მათზე უჯრედის მშრალი წონის დაახლოებით ნახევარი მოდის. ცილები, იგივე პროტეინები, საკმაოდ დიდი და რთული, პოლიმერული მოლეკულებია, რომელთა სტრუქტურულ ერთეულს ანუ მონომერს ამინომჟავები წარმოადგენენ. ცილებს მრავალმხრივი დატვირთვა აქვთ უჯრედში. ამიტომ ცილების კლასიფიკაცია სხვა პრინციპებთან ერთად, ამ კრიტერიუმითაცაა შესაძლებელი. მაგალითად, არსებობენ კატალიზური ფუნქციის მქონე ცილები - ფერმენტები; სტრუქტურული ფუნქციის მქონე ცილები (მაგალითად კოლაგენი); სატრანსპორტო ფუნქციის ცილები (მაგ. ჰემოგლობინი); დამცველობითი ფუნქციის ცილები (მაგ. ანტისხეულები); შეკუმშვადი ფუნქციის ცილები (მაგ. აქტინი და მიოზინი); რეგულატორული ფუნქციის მქონე ცილები (მაგ. ინსულინი); და რეცეპტორული ფუნქციის მქონე ცილები (რეცეპტორთა აბსოლუტური უმრავლესობა თავისი ბუნებით ცილაა). ამდენად იკვეთება, რომ ცილების შესწავლა უმნიშვნელოვანესი ხდება მრავალი საკითხის კვლევისას, ვინაიდან მათ უამრავი ძალზედ მნიშვნელოვანი ფუნქცია აკისრიათ. ამასთან უნდა აღინიშნოს, რომ მათი ფუნქციები თავის ტვინში განსაკუთრებულად მნიშვნელოვანია, სწორედ ცილები წარმოადგენენ ნეიროტრანსმისიის ქვაკუთხედს. გარდა ამისა, მნიშვნელოვანია გავითვალისწინოთ ისიც, რომ ნეიროქიმიური თვალსაზრისით ხაზგასასმელია არამხოლოდ ფიზიოლოგიური არამედ პათოლოგიური ბუნების მქონე ცილების არსებობა, რომელთა რიგშიცაა ისეთი ძალიან ცნობილი პათოლოგიური ცილები, როგორებიცაა პარკინსონის დაავადების მარკერი ალფა-სინუკლეინი და ალცჰაიმერის დაავადების ბიომარკერი - ბეტა-ამილოიდი. იმდენად, რამდენადაც ფსიქიკური აშლილობების მექანიზმი მეტად ნათქვამია და როგორც წესი, არ მოიცავს თვალსაზრისით მორფოლოგიურ ცვლილებებს, არამედ ძირითადად ეფუძნება ბიოქიმიურ ცვლილებებს, მათ პათოფიზიოლოგიაში საკვანძო როლს ასრულებენ ე.წ. სასიგნალო ცილები, რომელთა შესწავლა დიდად ჰფენს ნათელს ამა თუ იმ აშლილობის პათოგენეზსა თუ თერაპიული საშუალების მოქმედების მექანიზმს. ამ ყოველივეს გათვალისწინებით გასაგები ხდება თუ რაოდენ მნიშვნელოვანია ცილების შესწავლის მეთოდების ცოდნა ნებისმიერი მკვლევარისთვის, რომლის მიზანსაც თავის ტვინში მიმდინარე პროცესების შესწავლა წარმოადგენს.

§6.1 ცილების გამოლექვის მეთოდები

ცილების ერთ-ერთ ფუნდამენტურ თვისებას წარმოადგენს დენატურაცია, რომელიც მას ფიზიკო-ქიმიურ თვისებებს უცვლის. სწორედ ამ თვისებას ეფუძნება ცილების გამოლექვის მეთოდები.

§6.1.1 ცილების გამოლექვა ადულებით

ცილის ნეიტრალური ან სუსტად მჟავე ხსნარის დუღილისას, ცილის მოლეკულები ილექება. სრული დალექვა ხდება, თუ ხსნარი შეიცავს ელექტროლიტებს. გასათვალისწინებელია, რომ ძლიერ მჟავე ან ძლიერ ტუტე არეში გამოლექვა არ ხდება, ვინაიდან ცილები იღებენ ძლიერ დადებით ან უარყოფით მუხტს.

§6.1.2 ცილების გამოლექვა ორგანული გამხსნელების საშუალებით

ცილის ხსნარში დიდი რაოდენობით სპირტის ან აცეტონის დამატება იწვევს ცილების გამოლექვას, რაც ცილის კოლოიდური ნაწილების დეჰიდრატაციითაა გამოწვეული. გამოლექვა მიმდინარეობს სუსტ მჟავა ან ნეიტრალურ არეში და უმჯობესია ელექტროლიტების თანაობისას (მაგ. NaCl). საკმარისად დაბალ ტემპერატურებზე ($-15 - 0^{\circ}\text{C}$) შესაძლოა ცილის ნატიურ მდგომარეობაში შენარჩუნება, თუმცა ხანგრძლივი ან შედარებით მაღალ ტემპერატურაზე წარმართული პროცესი იწვევს დენატურაციას.

§6.1.3 ცილების გამოლექვა არაორგანული მჟავების საშუალებით

კონცენტრირებულ არაორგანულ მჟავებთან ურთიერთქმედებისას ცილები დენატურირდებიან და ილექებიან. ხანგრძლივი მოქმედებისას, ზოგიერთი კონცენტრირებული მჟავა, მაგალითად გოგირდ- და მარილმჟავა ახდენს ჰიდროლიზს და ნალექი დროთა განმავლობაში იხსნება. საკმაო პოპულარობით სარგებლობს გამოლექვა კონც. აზოტმჟავით. ეს რეაქცია ჰელერის სინჯის სახელითაცაა ცნობილი.

§6.1.4 ცილების გამოლექვა ორგანული მჟავების საშუალებით

ცილების გამოლექვის ერთ-ერთ კლასიკურ და ძალიან გავრცელებულ მეთოდს წარმოადგენს ტრიქლორძმარმჟავით (TCA) გამოლექვა. ამისათვის გამოიყენება 5-10% TCA. გასათვალისწინებელია, რომ ტრიქლორძმარმჟავას არ აქვს უნარი გამოლექოს ცილების დაშლის მაღალმოლეკულური პროდუქტები (პეპტიდები). ამ მიზნით შესაძლებელია სულფოსალიცილის მჟავის 5-10% ხსნარის გამოყენება.

§6.2 ცილების რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები

ცილებთან ნებისმიერი ტიპის მუშაობისას, ძალიან ხშირად ხდება საჭირო მათი რაოდენობრივი განსაზღვრა, იქნება ეს ფერმენტოლოგიური კვლევები, ამა თუ იმ ენზიმური აქტივობის ან კინეტიკური თავისებურებების შესასწავლად, იქნება ეს ახალი სრულიად უცნობი ცილის დეტექცია-დახასიათება, იქნება ეს სტრუქტურული თავისებურებების შესწავლა თუ სხვა. ამისათვის გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის სპექტროფოტომეტრიული მეთოდები, რომლებიც ცილის შემადგენლობაში არსებულ რომელიმე ამინომჟავასთან ფერადოვან რეაქციას ეფუძნება, რაც საბოლოო ჯამში გვაძლევს ამა თუ იმ სპეციფიკური ტალღის სხივის შუქშთანთქმის (OD, ინგლ. Optical Density) ცვლილებას.

§6.2.1 ცილის რაოდენობრივი განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდით

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ცილის სტანდარტის ხსნარი (ხარის შრატის ალბუმინი (BSA) 5მგ/მლ)
- 2) ბიურეტის რეაქტივი: 3გ CuSO_4 + 9გ ნატრიუმის ტარტრატი + 500მლ 0.2მოლ NaOH. ემატება 5გ KI და ივსება 1000მლ -მდე 0.2მოლ NaOH -ით

რეაქციის მსვლელობა:

1. სტანდარტულ სინჯარებში შეგვავსებს შესაბამისი ხსნარი 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 და 1მლ მოცულობით
2. საცდელ სინჯარებში შეგვავსებს ნიმუში 0.5 და 1.0მლ მოცულობით
3. ყველა სინჯარა ივსება 2მლ-მდე წყლით (მათ შორის Blank სინჯარები)
4. ყველა სინჯარას ემატება 3მლ ბიურეტის რეაქტივი, კარგად ირევა და ინკუბირდება 15წთ, $t = 37^\circ\text{C}$

შედეგები:

მიღებული ხსნარის შეფერილობის ინენსივობა იზომება სპექტროფოტომეტრულად, $\lambda = 520\text{ნმ}$ ტალღის სიგრძეზე. წინასწარ ხდება სტანდარტული მრუდის აგება, რის საფუძველზეც ხორციელდება ცილის კონცენტრაციის გამოითვლა, შემდეგი ფორმულით:

$$C (\text{მგ}\%) = (\text{OD}_{\text{Sample}} / \text{OD}_{\text{Standard}}) \times (\text{Conc}_{\text{Standard}} / \text{Aliquot}_{\text{Sample}}) \times 100$$

სადაც C - ცილის კონცენტრაციაა, OD - შუქშთანთქმა, ხოლო Aliquot - ნიმუშის შეტანილი მოცულობა.

§6.2.2 ცილის რაოდენობრივი განსაზღვრა ლოურის მეთოდით

§6.2.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A - ნატრიუმის კარბონატის 2% -იანი ხსნარი, დამზადებული 0.1მოლ NaOH -ზე (2გ Na_2CO_3 + 100მლ 0.1N NaOH).
- 2) რეაქტივი B - CuSO_4 -ის 0.5% -იანი ხსნარი, დამზადებული 1% -იან ნატრიუმის ციტრატზე.
- 3) რეაქტივი C - რეაქტივი A + რეაქტივი B, შეფარდებით 1:1
- 4) რეაქტივი D - ფოლინ-ჩოკალტეუს (Folin-Ciocalteu's) რეაქტივი*

რეაქციის მსვლელობა:

1. 0.5მლ ცილოვანი ჰომოგენატი + 2.5მლ რეაქტივი C
2. ინკუბაცია 10 წთ; $t=RT^{\circ}C$
3. + 0.25მლ რეაქტივი D
4. ინკუბაცია 30წთ; $t=RT^{\circ}C$

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრზე, $\lambda = 500-750\text{ნმ}$, სტანდარტული ხსნარის მიმართ, რომელიც შეიცავს ყველა რეაგენტს, გარდა ჰომოგენატისა, რომელიც ჩანაცვლებულია წყლით. ცილის რაოდენობა გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$C = K \times E$$

სადაც, C = ცილის კონცენტრაცია ; K = კონსტანტა; E - მიღებული შუქშთანთქმების საშუალო

§6.2.2 მეთოდი II

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A — ნატრიუმის კარბონატის 2% ხსნარი, დამზარებული 0.1მოლ NaOH -ზე (20გ Na_2CO_3 + 1000მლ 0.1N NaOH).
- 2) რეაქტივი B — CuSO_4 -ის 1% -იანი წყალხსნარი (1გ CuSO_4 + 100მლ H_2O)
- 3) რეაქტივი C — ნატრიუმ-კალიუმის ტარტრატის 2% -იანი წყალხსნარი (2გ ნატრიუმ-კალიუმის ტარტრატი + 100მლ H_2O)
- 4) რეაქტივი D — რეაქტივი B + რეაქტივი C (1:1) + რეაქტივი A (1:50)
- 5) რეაქტივი E — ფოლინ-ჩოკალტეუს (Folin-Ciocalteu) რეაქტივი (1:1 H_2O)

რეაქციის მსვლელობა:

რეაქტივი	Blank	Sample
ჰომოგენატი	---	Max 0.1მლ
H_2O	0.1მლ	ივსება 0.1მლ -მდე
რეაქტივი D	2მლ	2მლ
ინკუბაცია 5-10წთ; $t=RT^{\circ}C$		
რეაქტივი E	0.2მლ	0.2მლ
ინკუბაცია 30-45წთ; $t=RT^{\circ}C$		

შედეგები:

ცხრილზე ასახული პროცედურის შემდგომ, ხდება გაზომვა სპექტრო-ფოტომეტრიულად $\lambda = 700\text{ნმ}$ ან $\lambda = 750\text{ნმ}$ -ზე. ცილის რაოდენობა გამო-ითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$\text{მკგ protein}/100\text{მკგ} = (A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank}}) \times F$$

სადაც, F = სტანდარტული კოეფიციენტი

§6.2.3 მეთოდი III (მიკროპლანშეტისათვის)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A - ნატრიუმის კარბონატის 2%-იანი ხსნარი, დამზადებული 0.1მოლ NaOH -ზე (20გ Na_2CO_3 + 1000მლ 0.1N NaOH).
- 2) რეაქტივი B - CuSO_4 -ის 1% -იანი წყალხსნარი (1გ CuSO_4 + 100მლ H_2O)
- 3) რეაქტივი C - ნატრიუმ-კალიუმის ტარტრატის 2% -იანი წყალხსნარი (2გ ნატრიუმ-კალიუმის ტარტრატი + 100მლ H_2O)
- 4) რეაქტივი D - რეაქტივი B + რეაქტივი C (1:1) + რეაქტივი A (1:50)
- 5) რეაქტივი E - ფოლინ-ჩოკალტეუს (Folin-Ciocalteu's) რეაქტივი (1:1 H_2O)

რეაქციის მსვლელობა:

1. ბრტყელძირა მიკროპლანშეტზე, სტანდარტულ ფოსოში შეგვავს 25მკლ H_2O , საცდელ ფოსოებში კი ამავე მოცულობის ჰომოგენატი
2. ყველა ფოსოს ემატება რეაქტივი D, მოცულობით 250მკლ
3. ვაინკუბირებთ შეიკერზე 5-10წთ, $t=RT^\circ\text{C}$
4. ყველა ფოსოს ემატება 25მკლ რეაქტივი E
5. ვაინკუბირებთ შეიკერზე 30-45წთ, $t=RT^\circ\text{C}$

შედეგები:

ვზომავთ პლანშეტურ სპექტროფოტომეტრზე $\lambda = 620\text{ნმ}$

* ფოლინ-ჩოკალტეუს (Folin-Ciocalteu's) რეაქტივის დამზადება

საჭირო რეაქტივები:

- 1) დისტილირებული წყალი
- 2) ნატრიუმის ვოლფრამატი ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) - 50გ
- 3) ნატრიუმის მოლიბდატი ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) - 12.5გ
- 4) 80% -იანი ფოსფორმჟავა (H_3PO_4) - 25მლ
- 5) კონცენტრირებული მარილმჟავა (HCl) - 50მლ
- 6) გოგირდმჟავალითიუმი ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) - 75მგ
- 7) ბრომი
- 8) ფენოლფტალეინი
- 9) 0.1მოლ NaOH

მსვლელობა:

1. მრგვალძირა კოლბაში ისხმება 350მლ H_2O + 50გ ნატრიუმის ვოლფრამატი + 12.5გ ნატრიუმის მოლიბდატი და ირევა გახსნამდე
2. მიღებულ ხსნარს ემატება 25მლ ფოსფორმჟავა (85%) + 50მლ კონც. HCl
3. ნარევი დუღდება უკუმაცივარში 10სთ -ის განმავლობაში
4. დუღულის შემდგომ ემატება 75გ Li_2SO_4 + 25მლ H_2O + 3-5 წვეთი ბრომი
5. განმეორებით დუღდება, მაგრამ ამჯერად უკუმაცივრის გარეშე 15წთ, გამწოვში. ხსნარმა უნდა მიიღოს მოყვითალო შეფერილობა და ახლ უნდა გამწვანდეს.

6. ხსნარი ივსება 500მლ -მდე წყლით, კარგად ირევა და იფილტრება
7. მიღებულიდან აიღება 1მლ, განზავდება 10-ჯერ და იტიტრება 0.1მოლ NaOH -ით
8. მთელს მოცულობას ემატება წყალი ისე, რომ საბოლოო კონცენტრაცია გაუტოლდეს 1N -ს
9. ხსნარი დიდხანს ინახება მუქ, შლიფიან ჭურჭელში.

§6.2.3 ცილის რაოდენობრივი განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ცილის სტანდარტის ხსნარი (ხარის შრატის ალბუმინი (BSA) 20მკგ/მლ),
- 2) ბრედფორდის რეაქტივი: 100მგ კუმასი ბრილიანტის ლურჯი G250 + 50მლ 95% ეთანოლი. ჰერმეტიკულად ინკუბირდება 1სთ. ნელ-ნელა ემატება 100მლ 85% -იანი ორთოფოსფორმჟავა და ივსება 1000მლ -მდე წყლით. იფილტრება, რის შემდეგაც დასაშვებია რეაქტივის შენახვა მაქსიმუმ 2-3კვირა.
- 3) 0.2მოლ Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 ფოსფატის ბუფერი (pH = 7.5)

რეაქციის მსვლელობა:

1. სტანდარტულ სინჯარებში შეგვაქვს შესაბამისი ხსნარი 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 და 1მლ მოცულობით
2. საცდელ სინჯარებში შეგვაქვს ნიმუში 0.5 და 1.0მლ მოცულობით. სინჯარები, რომლებშიც შეგვაქვს 2-2მლ ფოსფატის ბუფერი და ბრედ-ფორდის რეაქტივი, წარმოადგენენ Blank სინჯარებს
3. ყველა სინჯარა ივსება 2მლ-მდე ფოსფატის ბუფერით
4. ყველა სინჯარას ემატება 2მლ ბრედფორდის რეაქტივი, კარგად ირევა და ინკუბირდება 15წთ, $t = 37^\circ\text{C}$

შედეგები:

ვგომავთ სპექტროფოტომეტრზე $\lambda = 595\text{nm}$. წინასწარ ხდება სტანდარტული მრუდის აგება, რის საფუძველზეც ხორციელდება ცილის კონცენტრაციის გამოითვლა, შემდეგი ფორმულით:

$$C (\text{მგ}\%) = (\text{OD}_{\text{Sample}} / \text{OD}_{\text{Standard}}) \times (\text{Conc}_{\text{Standard}} / \text{Aliquot}_{\text{Sample}}) \times 100$$

§6.3 ცილების ფრაქციონირებისა და დეტექციის მეთოდები

იმდენად, რამდენადაც მოლეკულურ ფსიქიატრიაში კვლევის ობიექტს წარმოადგენს თავის ტვინი ან მისი რომელიმე სტრუქტურა, საანალიზო ხსნარი უხშირესად ამ ქსოვილის ჰომოგენატია. ბუნებრივია აღნიშნულ ნარევეში უამრავი ცილა იყრის თავს, მათი ფრაქციონირება კი ერთ-ერთი ყველაზე საჭირო და მოხერხებული მეთოდია აღნიშნულ ნარევეში ცალკეული ცილების შესწავლისათვის. არსებობს ფრაქციონირების რამდენიმე ძირითადი მეთოდი, რომლებსაც ქვევით ქვეპარაგრაფებში განვიხილავთ.

§6.3.1 ცილების ფრაქციონირება გამომარილებით მეთოდით

გამომარილება ეწოდება ცილების ტუტე მეტალების მარილებით (NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ და ა.შ.) გამოლექვის მეთოდს. აღნიშნული მეთოდის უპირატესობა გახლავთ ის, რომ გამომარილების პროცესის შედეგად ცილები ფაქტობრივად არ იცვლიან თავის ფიზიკო-ქიმიურ თვისებებს, ფერმენტულ, ანტიგენურ, უმუნურ ან სხვა ტიპის ბიოლოგიურ აქტივობას, მაშასადამე რჩებიან ნატიურ მდგომარეობაში. გამომარილებისათვის შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას სხვადასხვა ტუტე მეტალის მარილები, მაგალითად NaCl , NH_4Cl , Na_2SO_4 და სხვა. თუმცა უხშირესად ამ მიზნისათვის იყენებენ ამონიუმის სულფატს, რომელთა გაჯერების ხარისხიც განისაზღვრება შესაბამისი ცხრილის მიხედვით (იხილეთ დანართი 4).

§6.3.2 ცილების ფრაქციონირება SDS-PAGE მეთოდით

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ელექტროდის ბუფერი x10: 3.03გ Tris-Base, 14.4გ გლიცინი, 1.0გ SDS გახსნილი 100მლ წყალში. pH 8.3
- 2) 1.5მოლ Tris-HCl, pH 8.8
- 3) 0.5მოლ Tris-HCl, pH 6.8
- 4) AA ხსნარი (30%): 29.2გ აკრილამიდი + 0.8გ ბისაკრილამიდი გახსნილი 100მლ წყალში.
- 5) 10% ამონიუმის პერსულფატი (APS)
- 6) ტეტრამეთილეთილენდიამინი (TEMED)
- 7) საფარი ბუფერი: იზოპროპანოლის 50% -იანი წყალხსნარი
- 8) 10% SDS
- 9) ლიზისის ბუფერი: 150მმოლ NaCl, 50მმოლ Tris-HCl (pH 8.0) + 100მკლ/100მლ 0.1% ტრიტონ X-100. ცდის დღეს ემატება 100მმოლ ფენილმეთილსულფონილ ფლუორიდი (PMSF) გახსნილი იზოპროპანოლში
- 10) ნიმუშების ბუფერი: 3.55მლ წყალი+1.25მლ 0.5მოლ Tris-HCl (pH 6.8) + 25მლ გლიცერინი + 2მლ 10% SDS + 0.2მლ ბრომფენოლის ლურჯი.

რეაქციის მსვლელობა:

1. ვაწყობთ ელექტროფორეზის მინებისაგან სენდვიჩს და ვაფიქსირებთ ისე, რომ მისი ძირი ჰერმეტიკულად იყოს ჩაკეტილი.
2. დავამზადოთ დამყოფი გელი, რომელთა კონცენტრაციებიც მოცემულია ცხრილში:

გელის %	H ₂ O (მლ)	AA ხსნარი (მლ)	1.5მოლ Tris-HCl	10% SDS
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
5%	5.7	1.7	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
9%	4.4	3.0	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
11%	3.7	3.7	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
13%	3.1	4.3	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
15%	2.4	5.0	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1
17%	1.7	5.7	2.5	0.1

ცხილში მოცემული რეაქტივების შერევის შემდეგ, ერთდროულად ვამატებთ 50მკლ APS-ს, 5მკლ TEMED-ს რის შემდეგაც სწრაფადვე ვასხამთ კასეტაში. კასეტაზე წინასწარ ვათავსებთ სავარცხელს და ვინიშნავთ მის საზღვარს. სწორედ ამ საზღვრამდე უნდა ჩავასხათ დამყოფი გელი.

3. ამის შემდეგ ვამატებთ რამდენიმე წვეთ საფარ ბუფერს, რათა გელის ზედაპირი გასწორდეს და ვაყოვნებთ მინიმუმ 40 წუთი, გელის სრულ გამყარებამდე.
4. გამყარების შემდეგ გელს გადავრეცხავთ გამოხდილი წყლით და ვამშრალავთ.
5. შემდეგ ვასხამთ მაკონცენტრირებელ გელს: 1.23მლ წყალი + 480მკლ 0.5მლ Tris-HCl (pH 6.8) + 20მკლ SDS + 260მკლ AA ხსნარი + 20მკლ APS და 2მკლ TEMED ერთდროულად.
6. მაშინვე ვათავსებთ მასში წყალში დასველებულ სავარცხელს და ვაყოვნებთ მინიმუმ 30 წუთ, გელის სრულ გამყარებამდე.
7. გამყარების შემდეგ ამოვიღებთ სავარცხელს, ფოსოებს ამოვრეცხავთ წყლით და კარგად გავამშრალავთ.
8. ვამზადებთ ნიმუშებს, რომლებიც ჰომოგენიზებულია ლიზისის ბუფერში და ცენტრიფუგირებული.
9. ნიმუშებს ემატება ნიმუშების ბუფერი შეფარდებით 1:1 (არსებობს x2, x4, x6 ბუფერებიც), რის შემდეგაც კარგად ირევა და ინკუბირდება 5 წუთი წყლის აბაზანაში, 95-100°C.
10. გაგრილების შემდეგ ნიმუშები შეგვაქვს ფოსოებში.
11. ამის შემდეგ ნიმუშები მზადაა ელექტროფორეზისთვის, ამიტომ კასეტას ვათავსებთ ელექტროგამტარ აპარატში, ვათავსებთ კონტეინერში, ვავსებთ შიდა და გარე სივრცეებს ელექტროდის ბუფერით რომელიც წინასწარ განვაზავეთ 10-ჯერ და ვატარებთ დენს 110v, დაახლოებით 120 წუთი. დრო იცვლება ნიმუშების, გელის პროცენტობის და გარემოს ტემპერატურასთან ერთად. ამიტომ ელექტროფორეზს ვაჩერებთ მაშინ, როცა ბრომფენოლის ლურჯის ხაზი მინის ბოლოდან დაახლოებით 2სმ-ით მაღლაა.
12. გელი ამოგვაქვს კასეტიდან და ვაგრძელებთ მასზე კვლევას, მაგალითად ვღებავთ კუმასის ლურჯით ან ვაგრძელებთ კვლევას Western Blotting-ის მეთოდით.

§6.3.3 ცილების ფრაქციონირება ნატიური ელექტროფორეზის მეთოდით

მთელი პროცესი ანალოგიურია SDS-PAGE ელექტროფორეზისა, ერთადეთი განსხვავებით - ყველგან SDS ჩანაცვლებულია დისტილირებული წყლით.

§6.3.4 ცილების სპეციფიკური დეტექცია Western-Blotting მეთოდით

SDS-PAGE ელექტროფორეზის შემდგომ, 10% გელში, რომელიც ჩვენ უკვე აღვწერეთ §6.3.2 პარაგრაფში, საჭიროა მოვახდინოთ ცილების გადატანა ნიტროცელულოზის მემბრანაზე. ამ პროცესს ტრანსფერი ეწოდება. ტრანსფერისათვის საჭიროა შემდეგი რეაქტივები:

- 1) ტრანსფერის ბუფერი: 25მმლ Tris-HCl (pH 8.3), 192მმლ გლიცინი, 20% მეთანოლი, 0.05% SDS.
- 2) TBS x10: 24.23გ Tris-Base + 80.06გ NaCl გახსნილი 1 ლიტრ ბიდისტილირებულ წყალში (pH 7.6)
- 3) TBST: 100მლ TBS x10 -ს ემატება 1მლ Tween 20 და ივსება 1 ლიტრამდე
- 4) 5% BSA
- 5) დეველოპერი და ფიქსელი
- 6) ფოტოფირი

რეაქციის მსვლელობა:

1. ელექტროფორეზის შემდეგ ამოგვაქვს გელი და გადაგვაქვს ტრანსფერის სენდვიჩზე. რომელზეც ვათავსებთ შემდეგი თანმიმდევრობით: ღრუბელი, ფილტრის ქაღალდი, გელი, მემბრანა, ფილტრის ქაღალდი. ღრუბელი. ტრანსფერი უნდა მიმდინარეობდეს იმავე მიმართულებით, როგორც მიდიოდა ელექტროფორეზი. გელი უნდა იყოს ანოდის მხარეს რათა ცილები გადავიდნენ მემბრანაზე ელექტრული ძალის მეშვეობით. ყველა კომპონენტი აწყობამდე უნდა იყოს დასველებული ტრანსფერის ბუფერში
2. ამის შემდეგ ვათავსებთ სენდვიჩს შესაბამის კასეტაში, ვავსებთ მას ტრანსფერის ბუფერით და ვატარებთ დენს, 100v, 60წთ.
3. ამის შემდეგ ვიღებთ მემბრანას და ვრეცხავთ დისტილირებული წყლით 5 წთ

4. ვამატებთ 5% ალბუმინს ისე, რომ მემბრანა სრულად დაიფაროს და ვბლოკავთ მთელი ღამის განმავლობაში, მაცივარში.
5. დაბლოკვის შემდეგ ვრეცხავთ 5 წუთი, TBST-ით
6. ვამატებთ პირველად ანტისხეულს (20მლ) და ვაინკუბირებთ 1-2 სთ (ან მთელი ღამე)
7. ამის შემდეგ პირველად ანტისხეულს ვასხამთ (ვინახავთ შემდგომი გამოყენებისთვის), ვრეცხავთ TBST-ით 5 წუთი, სამჯერ და ვამატებთ 20მლ მეორეულ ანტისხეულს (ზოგიერთ ანტისხეული არ საჭიროებს მეორეულის დამატებას, მაშინ ამ საფეხურს ვტოვებთ) და ვაინკუბირებთ მინიმუმ 1 სთ
8. გადავღვრით მეორეულ ანტისხეულს (ვარგისია მხოლოდ გახსნის დღეს) და ვრეცხავთ TBST-ით 5 წუთი, სამჯერ.
9. ვამატებთ წყალს და მემბრანა მზადაა გამჟღავნებისთვის
10. გამჟღავნებისათვის საწირთა აბსოლუტურად ბნელი ოთახი, ინფრაწითელი განათებით.
11. გამჟღავნებისთვის, გადავღვრით წყალს და ვამატებთ ლუმინოლის A და B რეაქტივების ხსნარს (1:1) მოცულობით 5-10მლ
12. შავ კასეტაში ვდებთ ფაილს, რომელშიც ვათავსებთ მემბრანას, ვადებთ ფოტოფირს და ვხურავთ მჭიდროდ 5-30 წუთით.
13. ამის შემდეგ ვიღებთ ფირს, ვათავსებთ მას ჯერ დეველოპერის ხსნარში, ხოლო მას შემდეგ რაც ფრაქციები აისახება ფირზე, გადავავქვს ფიქსელის ხსნარში, სადაც ვაყოვნებთ რამდენიმე წუთი. ამის შემდეგ, ფირს ვათავსებთ წყალში გადარეცხვისთვის და ვაშრობთ.

§6.3.5 ცილების ფრაქციონირება გელ-ფილტრაციური ქრომატოგრაფიის მეთოდით

გელ-ფილტრაციური ქრომატოგრაფია, ერთ-ერთი იმ მეთოდთაგანია, რომელიც გვაძლევს საშუალებას ცილები მათი მასის მიხედვით დავყოთ. იგი მიმდინარეობს რამდენიმე ეტაპად, კერძოდ:

1. სვეტის მომზადება - უპირველესად საჭიროა ე.წ. მყარი ფაზის იგივე მატრიცის შერჩევა, ანუ იმ მასალის რამაც უნდა დაყოს ჩვენი ცილოვანი ნარევი. არსებობს მრავალი ასეთი მატრიცა, როგორებიცაა Sephadex, Sepharose, Superdex და სხვა. მათშიც არის განსხვავებული ტიპები მაგ. Sephadex G10, Sephadex G50, Sephadex G100 და ა.შ იმისდა მიხედვით თუ რა მასის ცილის დეტექციაა სასურველი მკვლევარისათვის. თითოეულ მათგანს აქვს ინსტრუქცია თუ რა მიზნით უნდა გამოიყენოთ ის. აღნიშნული მატრიცა მჭიდროდაა განთავსებული სვეტში, ან თავად მკვლევარმა უნდა მოათავსოს სვეტში და გაჟლინოს შესაბამისი ნეიტრალური ბუფერით, რომელიც უზრუნველყოფს მის დაბალანსებულობას და ცილების განვლადობის შესაძლებლობას. ამის შემდეგ სვეტი მზადაა გამოსაყენებლად. ბუფერი ჩვეულებრივ ემთხვევა იმ pH და იონური სიძლიერის პირობებს, რომლებიც საჭიროა ნიმუშის ცილების სტაბილიზაციისთვის.

2. ნიმუშების მომზადება - ნიმუში, ჩვეულებრივ ბუფერულ ხსნარში, იფილტრება ან ცენტრიფუგირდება ნაწილაკების მოსაშორებლად. მნიშვნელოვანია, რომ ნიმუში თავისუფალი იყოს აგრეგატებისა და დიდი ნაწილაკებისგან, რამაც შეიძლება დააბინძუროს სვეტი და გამოიწვიოს მისი გაჭედვა. ნიმუშის ბუფერი უნდა იყოს იგივე, რაც სვეტის წონასწორობის ბუფერი, რათა თავიდან იქნას აცილებული რაიმე პრობლემა გამოყოფის პროცესში.

3. ნიმუშის ჩატვირთვა - ნიმუში ფრთხილად უნდა დაიტანოთ სვეტის ზედა ნაწილში. ნიმუშს ეძლევა გელის მატრიცაში ზეწოლის გარეშე შესვლის საშუალება. მას შემდეგ, რაც ნიმუში შედის გელში, იწყება ბუფერის გამოყენება, რათა დაიწყოს ელუციის პროცესი.

4. ელუციის პროცესი - ბუფერი (ასევე ცნობილი როგორც მობილური ფაზა) მუდმივად გადის სვეტში კონტროლირებადი დინების სიჩქარით. როდესაც ბუფერი მიედინება სვეტში, ის ატარებს ნიმუშს გელის მატრიცის გავლით. ნიმუშში მოლეკულები იყოფა მათი ზომის მიხედვით. ელუატი (სვეტიდან გამომავალი სითხე) გროვდება ფრაქციებად. თითოეული ფრაქცია შეიცავს სხვადასხვა ზომის მოლეკულებს. იმისათვის რომ შევძლოთ აღნიშნული ფრაქციების ზუსტი დეტექცია, ელუციისას საჭიროა ელუატმა გაიაროს ე.წ. დეტექტორი, რომელიც მოახდენს შუქშთანთქმის ასახვას 280ნმ სიგრძის ტალღის

საშუალებით და მკვლევარს ექნება საშუალება თვალი ადევნოს ფრაქციის საწყის და საბოლოო წერტილს.

7. საბოლოო ეტაპი - (1) სვეტის რეგენერაცია: ექსპერიმენტის შემდეგ, სვეტი ირეცხება ბუფერით, რათა გამოირეცხოს დარჩენილი ნიმუში და მომზადდეს მომავალი გამოყენებისთვის. ზოგიერთ მატრიცას შეიძლება დასჭირდეს სპეციალური რეგენერაციის მეთოდები, როგორიცაა მჟავით ან ძლიერ მჟავე pH - ის მქონე ბუფერით დამუშავება ან სხვა. (2) შენახვა: სვეტის ხანგრძლივად შენახვისას აუცილებელია ბუფერი შეიცავდეს კონსერვანტს (როგორიცაა ნატრიუმის აზიდი), რათა თავიდან იქნას აცილებული მიკრობული ზრდა.

§6.3.6 ცილების სპეციფიკური დეტექცია აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდით

ცილების აფინური ქრომატოგრაფია უაღრესად სპეციფიკური დეტექციის მეთოდია, რომელიც გამოიყენება ცილების გამოსაყოფად. მისი პრინციპი ეფუძნება ამა თუ იმ ცილის სპეციფიკურ ლიგანდთან შეკავშირების ანუ აფინურობის უნარს. აღნიშნული ლიგანდი კი იმობილიზებულია ქრომატოგრაფიულ მატრიცაზე.

1. სვეტის მომზადება - უპირველესად, როგორც ნებისმიერი რიპის ქრომატოგრაფიისას, საჭიროა მატრიცის შერჩევა. აფინური ქრომატოგრაფიის შემთხვევაში საჭიროა ლიგანდის შერჩევა. უნდა შეირჩეს ლიგანდი, რომელიც სპეციალურად უკავშირდება სამიზნე ცილას. იგი შეიძლება იყოს ანტისხეული, სუბსტრატი, კოფაქტორი ან ნებისმიერი მოლეკულა, რომელსაც აქვს მაღალი აფინურობა საკვლევ პროტეინთან. მაგალითისათვის ეს შეიძლება იყოს უბრალოდ ნახშირწყლოვანი ჯატვიც კი თუ საქმე ეხება ნახშირწყალსპეციფიკურ ცილებს, როგორებიცაა ლექტინები. ლიგანდი კოვალენტურად არის დაკავშირებული მყარ მატრიცასთან (როგორიცაა აგაროზა, სეფაროზა ან სხვა ფისები). მატრიცა კი განტავსებულია ქრომატოგრაფიის სვეტში. სვეტი დაბალანსებული უნდა იყოს ბუფერით, რომელიც შეესაბამება იმ pH-ს, იონურ სიძლიერეს და სხვა პირობებს, რომლებიც ოპტიმალურია ლიგანდისა და პროტეინის ურთიერთქმედებისთვის.

2. პროტეინის ნიმუშის მომზადება - ცილის ნიმუში მზადდება ბუფერში, რომელიც თავსებადია შეკავშირების პირობებთან. ნიმუში ჩვეულებრივ უნდა გაიწმინდოს ნაწილაკებისაგან ფილტრაციით ან ცენტრიფუგირებით. აუცილებელია, რომ ნიმუშის ბუფერი იყოს იგივე, რაც სვეტის წონასწორობის ბუფერი.

3. ნიმუშის ჩატვირთვა - ცილის ნიმუში ფრთხილად დაიტანება სვეტზე. ნიმუშის გავლისას სამიზნე ცილა სპეციალურად უერთდება იმობილიზებულ ლიგანდს, ხოლო სხვა ცილები ვერ უკავშირდებიან და ირეცხებიან. ნიმუშის ჩატვირთვის შემდეგ, სვეტი ირეცხება სვეტის წონასწორობის ბუფერის რამდენიმე მოცულობით, რათა ჩამოირეცხოს შეუკავშირებელი ცილები. ეს ნაბიჯი გადამწყვეტია არასპეციფიკური ურთიერთქმედების შესამცირებლად და იმის უზრუნველსაყოფად, რომ მხოლოდ სამიზნე ცილა დარჩეს სვეტში.

4. სამიზნე პროტეინის ელუცია - დაკავშირებული ცილა გამოირეცხება სვეტიდან გამორეცხვის ბუფერის გამოყენებით. გამორეცხვის საერთო სტრატეგიები მოიცავს: (1) კონკურენტული ელუცია: გამოიყენება ხსნარი, რომელიც შეიცავს თავისუფალ ლიგანდს ან მოლეკულას, რომელიც კონკურენტულად უწევს ცილას იმობილიზებულ ლიგანდთან შეკავშირებისთვის. მაგალითად, თუ ლიგანდი არის ანტისხეული, ცილა შეიძლება გამოირეცხოს ეპიტოპის ან ანტიგენის შემცველი ხსნარის დამატებით. (2) pH ცვლა: გამორეცხვის ბუფერის pH იცვლება ცილასა და ლიგანდს შორის ურთიერთქმედების დარღვევის მიზნით. მაგალითად, მჟავე ან ტუტე პირობებმა შეიძლება შეამციროს აფინურობა და გამოიწვიოს ცილის გამორეცხვა. (3) იონური სიძლიერე: გამორეცხვის ბუფერში მარილის კონცენტრაციის გაზრდამ შეიძლება დაარღვიოს იონური ურთიერთქმედება, რაც გამოიწვევს ცილის გამოყოფას. (4) მადენატურიკული ფაქტორები: ზოგიერთ შემთხვევაში, მსუბუქი დეტერგენტები (მაგ. შარდოვანა) გამოიყენება ცილა-ლიგანდის ურთიერთქმედების დასარღვევად.

5. შეგროვება და ანალიზი - მსგავსად გელ-ფილტრაციული ქრომატოგრაფიისა, ულტრაიისფერი დეტექტორის საშუალებით ხდება გამორეცხილი ცილის შეგროვება ფრაქციებად. სამიზნე ცილა, როგორც წესი, გვხვდება პირველ რამდენიმე ფრაქციაში ელუციის დაწყების შემდეგ.

6. სვეტის რეგენერაცია და ხელახალი გამოყენება - (1) გადარეცხვა: გამორეცხვის შემდეგ, სვეტი ირეცხება დამაკავშირებელი ბუფერით, რათა ჩამოირეცხოს დარჩენილი გამორეცხვის ბუფერი და სხვა ხელახლა დაბალანსებული იყოს შემდეგი გამოყენებისთვის. (2) რეგენერაცია: პერიოდულად,

სვეტის რეგენერაცია შესაძლებელია სხვადასხვა ისეთი საშუალებების გამოყენებით, როგორიცაა მაღალიონური ან მჟავა ხსნარები. (3) შენახვა: სვეტი ინახება შესაფერის ბუფერში, რომელიც შეიცავს კონსერვანტს (ნატრიუმის აზიდის ან სხვა) მიკრობული ზრდის თავიდან ასაცილებლად.

§6.3.7 ცილების ფრაქციონირება მაღალ-ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიით

მაღალ-ეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფია (HPLC) არის ნატიფი ანალიტიკური ტექნიკა, რომელიც გამოიყენება ნარევის კომპონენტების გამოყოფის, იდენტიფიკაციისა და რაოდენობრივი ანალიზისათვის. HPLC მუშაობს მაღალი წნევის ქვეშ, რათა გადაიტანოს გამხსნელები დახურული სვეტის მეშვეობით, რომელშიც მოთავსებულია მყარი ფაზა.

1. **HPLC სისტემის მომზადება** - უპირველესად საჭიროა სვეტისა და მყარი ფაზის შერჩევა. ეს ხდება ნიმუშის ბუნებისა და საჭირო განცალკევების მიხედვით. სვეტები განსხვავდება სიგრძით, დიამეტრით და სტაციონარული ფაზის ნაწილაკების ზომით. მატრიცა შეიძლება იყოს სილიციუმზე დაფუძნებული, შებრუნებულ-ფაზური (C18), იონცვლადი ან სხვა მასალის. შემდგომ აუცილებელი ხდება მობილური ფაზის შერჩევა. მობილური ფაზა (გამხსნელი) შეირჩევა ნიმუშის ქიმიური თვისებების მიხედვით. ეს შეიძლება იყოს ერთი გამხსნელი ან ნარევი (მაგ., წყალი აცეტონიტრილით, მეთანოლთან ან ბუფერთან ერთად). არჩევანი დამოკიდებულია ნიმუშის პოლარობაზე, ხსნადობაზე და სტაბილურობაზე.

2. **ნიმუშის მომზადება** - ნიმუშის მომზადება: ნიმუში მზადდება მობილურ ფაზასთან თავსებად გამხსნელში გახსნით. ის შეიძლება იყოს გაფილტრული ან ცენტრიფუგირებული ნაწილაკების მოსაშორებლად, რომლებმაც შეიძლება გაჭედოს სვეტი. აუცილებელია ხდებოდეს კონცენტრაციის რეგულირება და ნიმუშის კონცენტრაცია მორგებული იყოს ისე, რომ მოხვდეს დეტექტორის დიაპაზონში.

3. **სვეტის დაბალანსება** - (1) სისტემის დაყენება: HPLC სისტემა აწყობილია და სვეტი უკავშირდება სისტემას. მობილური ფაზა დეგაზირებულია (ჰაერის ბუშტების მოსაშორებლად) და იტვირთება სისტემაში. (2) სვეტის წონასწორობა: სვეტი დაბალანსებულია მობილურ ფაზასთან, მაშინ როცა მისი გატარებით სვეტში სასურველი დინების სიჩქარით, საბაზისო ხაზი სტაბილურია. ეს ნიშნავს, რომ სტაციონარული ფაზა გაჯერებულია და მზად არის ნიმუშის შესატანად.

4. **ნიმუშის ინექცია** - მომზადებული ნიმუში შეჰყავთ HPLC სისტემაში ინ�ექტორის ან ავტოსამპლერის საშუალებით. ინექციის მოცულობა ჩვეულებრივ რამოდენიმე მიკროლიტრის დიაპაზონშია. სისტემა იწყებს მოძრავი ფაზის გადატუმბვას სვეტის გავლით და თან ატარებს ნიმუშს. ნაკადის სიჩქარე, სვეტის ტემპერატურა და წნევა საგულდაგულოდ კონტროლდება.

5. **გამოყოფა სვეტში** - ურთიერთქმედება სტაციონარულ ფაზასთან: როდესაც ნიმუშის კომპონენტები მოძრაობენ სვეტში, ისინი ურთიერთქმედებენ სტაციონარულ ფაზასთან. HPLC-ის ტიპის მიხედვით: (1) შებრუნებული ფაზის HPLC: არაპოლარულ კომპონენტებს უფრო ძლიერი ურთიერთქმედება აქვთ ჰიდროფობიურ სტაციონარულ ფაზასთან და იხსნება მოგვიანებით, ხოლო პოლარული კომპონენტები უფრო ადრე. (2) ნორმალური ფაზის HPLC: პოლარულ კომპონენტებს უფრო ძლიერი ურთიერთქმედება აქვთ პოლარულ სტაციონარულ ფაზასთან და იხსნება მოგვიანებით, ხოლო არაპოლარული კომპონენტები უფრო ადრე. (3) იონცვლადი ფაზის HPLC: დამუხტული მოლეკულები ურთიერთქმედებენ საპირისპიროდ დამუხტულ ჯგუფებთან სტაციონარულ ფაზაზე, ელუცია კონტროლდება მობილური ფაზის იონური სიძლიერით ან pH-ით. და სხვა.

6. **გამოვლენა და მონაცემთა მოპოვება** - როდესაც კომპონენტები გამოდიან სვეტიდან, ისინი გადიან დეტექტორში. ჩვეულებრივ, დეტექტორები მოიცავს: (1) UV/Vis დეტექტორი: ზომავს შთანთქმას კონკრეტულ ტალღის სიგრძეზე; ჩვეულებრივ გამოიყენება ორგანული ნაერთებისთვის. (2) ფლუორესცენტური დეტექტორი: ზომავს სინათლის გამოყოფას ფლუორესცენტური ნაერთებიდან. (3) რეფრაქციული ინდექსის დეტექტორი: ზომავს მოძრავი ფაზის რეფრაქციული ინდექსის ცვლილებებს; გამოიყენება ნაერთებისთვის, რომლებსაც არ აქვთ UV შთანთქმა. (4) მასსპექტრომეტრია (LC-MS): უზრუნველყოფს კომპონენტების გამოყოფას და მასის ანალიზს. მონაცემთა შეგროვება ხდება ასე, დეტექტორი წარმოქმნის სიგნალს (პიკი ქრომატოგრამაზე) თითოეული კომპონენტის გამოყოფისას. შეკავების დრო (დრო, რომელიც სჭირდება კომპონენტს სვეტში გადაადგილებისთვის) და პიკის ფართობი ჩაწერილია, რაც უზრუნველყოფს ხარისხობრივ და რაოდენობრივ ინფორმაციას.

7. **ანალიზი და ინტერპრეტაცია** - (1) პიკის იდენტიფიკაცია: თითოეული პიკის შეკავების დრო შედარებულია სტანდარტებთან ან შეკავების ცნობილ დროებთან კომპონენტების იდენტიფიცირებისთვის. (2) რაოდენობრივი განსაზღვრა: თითოეული პიკის ქვეშ არსებული ფართობი პროპორციულია ნიმუშის კომპონენტის კონცენტრაციისა. კალიბრაციის მრუდები (მომზადებული

სტანდარტებით) გამოიყენება თითოეული კომპონენტის რაოდენობის გასაზომად. (3) რეზოლუციის შეფასება: გამოყოფის ეფექტურობა ფასდება მწვერვალებს შორის გარჩევადობით, რაც უზრუნველყოფს კომპონენტების ადეკვატურად განცალკევებას.

§6.4 ცილების ფუნქციური ჯგუფების განსაზღვრის მეთოდები

§6.4.1 სულფჰიდრილური (SH) ჯგუფების რაოდენობრივი განსაზღვრა

სულფჰიდრილური (SH) ჯგუფების რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის რამდენიმე მეთოდის გამოყენებაა შესაძლებელი. აქედან ერთ-ერთი ყველაზე მოსახერხებელია ელმანის მოდიფიცირებული მეთოდი, რომელიც საშუალებას იძლევა განსვსაზღვროთ ხსნარში SH ჯგუფების რაოდენობა და ასევე დავადგინოთ მათგან რამდენია ცილასთან შეკავშირებული და რამდენი ე.წ. თავისუფალი (მაგ. გლუტათიონი).

ამ პროცედურისთვის ჩვენ გამოვიყენებთ DTNB (5,5-დიტიო-ბის-(2-ნიტრობენზოის მუჟავა)) გახსნილი PBS-ში (pH 8.0). ლექტინის ხსნარი შერეული იყო ელმანის რეაგენტის ხსნართან და ინკუბირებული იყო 10 წუთის განმავლობაში 37 გრადუს ცელსიუსზე. შთანთქმის შემდეგ იზომებოდა ყოველ წუთში მთლიანი ხანგრძლივობით 20 წუთი 412 ნმ. ამის შემდეგ შეფასდა თავისუფალი -SH ჯგუფების რაოდენობა ნიმუშში. ამის მისაღწევად ჩატარდა მსგავსი პროცედურა, ლექტინის ხსნარში წინასწარ დაემატა 5% TCA (ტრიქლორომარმუჟავა). ნარევი შემდეგ ინკუბირებული იყო და შემდგომში ცენტრიფუგირებული იყო, SH ჯგუფები განისაზღვრა მიღებულ სუპერნატანში. შეკრული SH ჯგუფების რაოდენობა გამოითვლებოდა თავისუფალი -SH ჯგუფების ოდენობის გამოკლებით საერთო რაოდენობას. როგორც სტანდარტი, ცისტეინის ხსნარი გამოიყენებოდა კონცენტრაციებში 1,6 მმოლ-დან 0,025 მმოლ-მდე.

საჭირო რეაქტივები:

- 1) DTNB (5,5-დიტიო-ბის-(2-ნიტრობენზოის მუჟავა))
- 2) ნატრიუმის კარბონატი (Na_2CO_3)
- 3) PBS (pH 8.0)
- 4) 5% ტრიქლორომარმუჟავა(TCA)
- 5) ცისტეინი

რეაქციის მსვლელობა:

1. გამზადებთ ელმანის რეაგენტს: 1.5მგ Na_2CO_3 + 4მგ DTNB + 1მლ PBS
2. საცდელ სინჯარებში შეგვავს ნიმუში 0.2მლ მოცულობით. საჭიროა ერთი ნიმუშის შეტანა ორ სინჯარაში, რათა მოხდეს საერთო და თავისუფალი სულფჰიდრილური ჯგუფების განსაზღვრა.
3. ამ სინჯარების ერთ ნახევარს ემატება 25მკლ TCA, ინკუბირდება 10წთ და ცენტრიფუგირდება მაგიდის ცენტრიფუგაზე 5წთ. ეს ნიმუშები გვაჩვენებს თავისუფალი SH ჯგუფების კონცენტრაციას.
4. სტანდარტულ სინჯარებში შეგვავს ცისტეინი, ჯერადად გატიტრული 1.6 მმოლ-დან 0.025 მმოლ-მდე იმავე მოცულობით.
5. ყველა სინჯარას ემატება 1.8მლ PBS და 0.07მლ ელმანის რეაგენტი კარგად ირევა და ინკუბირდება 10წთ, $t = 37^\circ\text{C}$ ან 15°C , RT°C
6. იზომება შუქშთანთქმა ყოველ 3წთ-ში ერთხელ, 20 წუთის განმავლობაში. $\lambda = 412\text{ნმ}$

შედეგები:

წინასწარ ხდება სტანდარტული მრუდის აგება, რის საფუძველზეც ხორციელდება SH ჯგუფების კონცენტრაციის გამოითვლა (მმოლ). იმისათვის, რომ გავიგოთ ცილის სტრუქტურაში შემავალი სულფჰიდრილების რაოდენობა, საჭიროა საერთო კონცენტრაციას გამოვაკლოთ თავისუფალი SH ჯგუფების კონცენტრაცია.

თავი VII

ლიპიდების შესწავლის მეთოდები

ლიპიდები არის ბუნებაში გავრცელებული მაკრომოლეკულების საკმაოდ დიდი ჯგუფი, რომელიც მოიცავს ცხიმებს, ზეთებს, ფოსფოლიპიდებს, სტეროიდებს და ცვილებს. ისინი ჰიდროფობური ან ამფიპათიური მოლეკულებია, რაც იმას ნიშნავს, რომ ისინი ძირითადად წყალში უხსნადია, მაგრამ შეუძლიათ დაშლა არაპოლარულ გამხსნელებში. ლიპიდები ასრულებენ მნიშვნელოვან როლს ორგანიზმში, მათ შორისაა ენერგეტიკული, სტრუქტურული და სასიგნალო ფუნქციები. ისინი უჯრედის მემბრანების ფუნდამენტური კომპონენტებია, წამოადგენენ ენერგიის რეზერვს და მოქმედებენ როგორც სასიგნალო მოლეკულები, რომლებიც არეგულირებენ სხვადასხვა ფიზიოლოგიურ პროცესებს. ლიპიდები შეიძლება დაიყოს რამდენიმე კატეგორიად მათი ქიმიური სტრუქტურისა და ფუნქციის მიხედვით. მაგალითად, ტრიგლიცერიდები არის ლიპიდების ტიპი, რომელიც ინახება ცხიმოვან ქსოვილში და ასრულებს ენერგიის ძირითადი წყაროს ფუნქციას. ფოსფოლიპიდები უჯრედის მემბრანების გადამწყვეტი კომპონენტებია, რომლებიც ქმნიან ლიპიდურ ბიშრეს, რომელიც გამოყოფს უჯრედის შიგთავსს გარემოსგან. სტეროიდების კლასიკური წარმომადგენელია ქოლესტერინი, რომელიც თამაშობს მნიშვნელოვან როლს მემბრანის სტრუქტურასა და ფუნქციონირებაში, ასევე ის გახლავთ ისეთი ჰორმონების წინამორბედი, როგორიცაა ესტროგენი და ტესტოსტერონი. გარდა ამისა, ლიპიდები, როგორიცაა ეიკოზანოიდები, მონაწილეობენ ანთებით რეაქციებში და სხვა უჯრედულ სასიგნალო გზებში. ლიპიდების კვლევას უდიდესი მნიშვნელობა აქვს მოლეკულური ფსიქიატრიისა და ნეიროქიმიის სფეროებში რამდენიმე მიზეზის გამო. პირველ რიგში ესაა ტვინის სტრუქტურისა და ფუნქციონირების შესწავლა. ტვინი შედგება ლიპიდების მაღალი კონცენტრაციისგან, განსაკუთრებით ნეირონებისა და გლიური უჯრედების მემბრანები. ამასგარდა, მიელინი, ლიპიდებით მდიდარი ნივთიერებაა, რომელიც ქმნის საიზოლაციო გარსს ნერვული ბოჭკოების ირგვლივ, რაც ელექტრული იმპულსების სწრაფი გადაცემის საშუალებას იძლევა. ლიპიდური შემადგენლობის ან მეტაბოლიზმის დარღვევამ შეიძლება გამოიწვიოს ტვინის ფუნქციის დარღვევა, რაც იწვევს ნევროლოგიურ და ფსიქიატრიულ დარღვევებს. ისინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებში, როგორიცაა ალცჰეიმერის, პარკინსონის და ჰანტინგტონის დაავადებები. ლიპიდები არა მხოლოდ უჯრედების სტრუქტურული კომპონენტებია, არამედ მოქმედებენ როგორც სასიგნალო მოლეკულები, რომლებიც არეგულირებენ ბიოლოგიური პროცესების ფართო სპექტრს, მათ შორის ანთებას, უჯრედების ზრდას და აპოპტოზს (უჯრედების დაპროგრამებული სიკვდილი). თავის ტვინში, ლიპიდიდან მიღებული სასიგნალო მოლეკულები, როგორიცაა ენდოკანაბინოიდები და სფინგოლიპიდები, გადამწყვეტ როლს თამაშობენ ნეიროტრანსმისიის მოდულაციაში, სინაფსური პლასტიურობასა და ნეიროანთებით პროცესებში. ამ ლიპიდური სასიგნალო გზების დისრეგულაცია დაკავშირებულია სხვადასხვა ფსიქიატრიულ და ნევროლოგიურ დარღვევებთან, როგორებიცაა დეპრესია, შფოთვა და შიზოფრენია. ტვინის ფუნქციონირებასა და დაავადებებში ლიპიდების ცენტრალური როლის გათვალისწინებით, ისინი წარმოადგენენ მნიშვნელოვან მოლეკულებს ფარმაკოლოგიური კუთხითაც. მაგალითად, ცხიმოვანი მჟავა ამიდის ჰიდროლაზას (FAAH) ინჰიბიტორები, მიჩნეულია შფოთვისა და ტკივილის სამკურნალო პერსპექტიულ პრეპარატად. გარდა ამისა, თერაპიები, რომლებიც მიზნად ისახავს თავის ტვინში ნორმალური ლიპიდური შემადგენლობის აღდგენას, როგორიცაა ქოლესტერინის დამწვევი პრეპარატები ან ომეგა 3 ცხიმოვანი მჟავების დანამატები, შესწავლება როგორც პოტენციური ნეიროპროტექტორები.

§7.1 ლიპიდების გამოყოფა ფოლჩის მეთოდით

ლიპიდების გამოყოფის ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული გზა ფოლჩის (Folch J. 1957) მეთოდით ექსტრაქციაა.

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ქლოროფორმი
- 2) მეთანოლი
- 3) ფიზიოლოგიური ხსნარი (0.9% NaCl)

რეაქციის მსვლელობა:

1. რეაქტივი A -ს დამზადება: ქლოროფორმი და მეთანოლი ერევა ერთმანეთს შეფარდებით 2:1
2. ქსოვილოვან ჰომოგენატს ემატება რეაქტივი A შეფარდებით 1:20 და ერევა შეიკერზე 15-20 წთ.
3. მიღებული ხსნარი ცენტრიფუგირდება მაგიდის ცენტრიფუგაზე, 10წთ
4. მიღებული ექსტრაქტი ირეცხება წყლით ან ფიზიოლოგიური ხსნარით (1:5) არალიპიდური ფრაქციის მოსაშორებლად.

შედეგები:

ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა გამოვყოთ უჯრედული ლიპიდების დაახლოებით 95%

§7.2 ლიპიდების რაოდენობრივი განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ქლოროფორმი
- 2) მეთანოლი
- 3) ფიზიოლოგიური ხსნარი (0.9% NaCl)

რეაქციის მსვლელობა:

1. ფოსფო-ვანილინის რეაქტივის დამზადება: 0.6გ ვანილინი იხსნება 100მლ ცხელ დისტილირებულ წყალში. ამის შემდეგ იგი ივსება 500მლ-მდე 85%-იანი ფოსფორმუავით
2. ფოლჩის მეთოდით მიღებული ქლოროფორმის ფრაქცია (იხ. §7.1) გადაგვაცეს მიკროპლანშეტის ფოსოებში (300-300მკლ).
3. პლანშეტს ვათავსებთ 90°C -ზე დაახლოებით 20-30წთ, ქლოროფორმის სრულ ამოშრობამდე.
4. ამომშრალ ფოსოებში ვამატებთ 50-50მკლ 98%-იან გოგირდმუავას და კვლავ ვათავსებთ 90°C -ზე 20წთ.
5. ფოსოებს ემატება 150-150მკლ ფოსფო-ვანილინის პრეპარატი
6. გრილდება დაახლოებით 10წთ და იზომება შუქშთანთქმა 530ნმ-ზე

შედეგები:

სტანდარტი იგება სოიოს ზეთით. გრაფიკს უნდა ჰქონდეს წრფივი პირდაპირპროპორციული დამოკიდებულება ლიპიდთა კონცენტრაციასთან.

თავი VIII

ნახშირწყლების შესწავლის მეთოდები

ნახშირწყლები მაკრომოლეკულათა ერთ-ერთი ძირითადი კლასია, რომელიც აუცილებელია სიცოცხლისთვის. ისინი წარმოადგენენ ენერგიის ძირითად წყაროს უჯრედებისთვის და ასრულებენ კრიტიკულ როლს სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში. ნახშირწყლები შეიძლება დაიყოს სამ ძირითად ტიპად: მონოსაქარიდები (მარტივი შაქარი, როგორიცაა გლუკოზა და ფრუქტოზა), დისაქარიდები (როგორიცაა საქაროზა და ლაქტოზა) და პოლისაქარიდები (რთული ნახშირწყლები, როგორიცაა სახამებელი, გლიკოგენი და ცელულოზა). ნახშირწყლები სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანია არა მხოლოდ როგორც ენერგიის წყარო, არამედ როგორც სტრუქტურული კომპონენტები და სასიგნალო მოლეკულები. ნახშირწყლები არის ენერგიის ძირითადი წყარო ტვინისთვის, რომელიც მოიხმარს სხეულის მთლიანი ენერგიის დაახლოებით 20%-ს, მიუხედავად იმისა, რომ წარმოადგენს სხეულის წონის მხოლოდ 2%-ს. გლუკოზის მეტაბოლიზმის დარღვევამ შეიძლება გამოიწვიოს კოგნიტური ფუნქციის დარღვევა, განწყობის დარღვევა და ნეიროდეგენერაციული დაავადებებიც კი. ნახშირწყლებისა და მათი მეტაბოლიზმის გაგენა ტვინის ფუნქციონირებაზე დიდია და სწორედ მასთანაა დაკავშირებული სხვადასხვა მეტაბოლური დარღვევები, რომლებიც გავლენას ახდენს ტვინზე. ნახშირწყლები ასევე მონაწილეობენ ნეიროტრანსმიტერების, ქიმიური მესინჯერების სინთეზში, რომლებიც ნეირონებს შორის კომუნიკაციის საშუალებას იძლევა. გლუკოზის მეტაბოლიზმი მჭიდროდ არის დაკავშირებული სხვადასხვა ნეიროტრანსმიტერების სინთეზთან, როგორიცაა სეროტონინი და დოფამინი, რომლებიც მთავარ როლს ასრულებენ განწყობის რეგულირებაში, ჯილდოს გადამუშავებასა და სხვადასხვა კოგნიტურ ფუნქციებში. ნახშირწყლების მეტაბოლიზმსა და ნეიროტრანსმიტერების ფუნქციას შორის ურთიერთობის გაგება აუცილებელია ფსიქიატრიული აშლილობების მოლეკულური საფუძვლების გასარკვევად, როგორიცაა დეპრესია, შფოთვა და შიზოფრენია.

§8.1 ნახშირწყლების რაოდენობრივი განსაზღვრა

§8.1.1 გლუკოზის რაოდენობრივი განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.9% NaCl
- 2) 5% ZnSO₄
- 3) 0.3N NaOH
- 4) 1% o-ტოლიდინი დამზადებული 96%-იან ეთანოლზე
- 5) 0.25მოლ აცეტატის ბუფერი (pH 4.8)
- 6) პირშუმხას პეროქსიდაზა
- 7) გლუკოზოოქსიდაზა
- 8) გლუკოზა
- 9) 0.1% ბენზოის მჟავა

რეაქციის მსვლელობა:

1. სტანდარტული ხსნარის დამზადება: 50, 70, 100, 120, 150მგ გლუკოზა იხსნება 100მლ 0.1% -იან ბენზოის მჟავაში
2. სამუშაო ხსნარის დამზადება: 80მლ აცეტატის ბუფერში იხსნება 1მგ გლუკოზოოქსიდაზა, 1მგ პირშუმხას პეროქსიდაზა და ემატება 1მლ 1% o-ტოლიდინი. ამის შემდეგ ხსნარი ივსება 100მლ -მდე
3. 1მლ ნიმუშს ემატება 3მლ სამუშაო ხსნარი და იზომება სპექტროფოტომეტრიულად 620ნმ -ზე.
4. Blank სინჯარებში ნიმუშის ნაცვლად შეგვავს წყალი, ხოლო სტანდარტულ სინჯარებში გლუკოზის ხსნარი.

შედეგები:

გამოთვლა ხდება გლუკოზის სტანდარტული მრუდის მიხედვით

§8.1.2 გლუკოზისა და გლიკოგენის რაოდენობრივი განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ანტრონის 0.2% -იანი ხსნარი დამზადებული 95%-იან H_2SO_4 -ზე. (იგი მზადდება ცდის წინ და იდგმევა ცინულოვან აბაზანაში)
- 2) გლუკოზის სტანდარტული ხსნარი 0.1% ბენზოის მჟავაზე
- 3) 30% KOH
- 4) 96% -იანი ეთანოლი

რეაქციის მსვლელობა:

გლუკოზის განსაზღვრისთვის

1. სინჯარებში, რომლებიც განთავსებულია ცინულოვან აბაზანაში თავსდება 2.5მლ ნიმუში
2. ნიმუშებს ემატება 5მლ ანტრონის ხსნარი
3. სინჯარები ირევა და იდგმევა $90^{\circ}C$, 10წთ და გადაგვაქვს ცინულოვან აბაზანაზე.
4. ამის შემდეგ ხსნარი იზომება 620ნმ -ზე

გლიკოგენის განსაზღვრისთვის (მეთოდი I გლიკოგენის მაღალი შემცველობისთვის)

1. 1მლ ჰომოგენატს ემატება 3მლ KOH
2. სინჯარები ილუქება და თავსდება მდულარე წყლის აბაზანაზე 20წთ, შემდეგ კი გადაგვაქვს ცინულის აბაზანაზე.
3. მიღებული ხსნარი გადაგვაქვს 25 ან 50მლ -იან კოლბაში და ვავსებთ წყლით (ისე რომ კონცენტრაცია დაახლოებით 3-30მკგ/1მლ)
4. 2.5მლ მიღებული ხსნარი გადაგვაქვს ცინულოვან აბაზანაში ჩადგმულ სინჯარებში
5. ნიმუშებს ემატება 5მლ ანტრონის ხსნარი
6. სინჯარები ირევა და იდგმევა $90^{\circ}C$, 10წთ და გადაგვაქვს ცინულოვან აბაზანაზე.
7. ამის შემდეგ ხსნარი იზომება 620ნმ -ზე

გლიკოგენის განსაზღვრისთვის (მეთოდი II გლიკოგენის დაბალი შემცველობისთვის)

1. ცენტრიფუგის სინჯარაში ისხმევა 1მლ ჰომოგენატი და ემატება 3მლ KOH
2. სინჯარები ილუქება და თავსდება მდულარე წყლის აბაზანაზე 20წთ, შემდეგ კი გადაგვაქვს ცინულის აბაზანაზე.
3. მიღებულ ხსნარს ემატება ტოლი მოცულობით ეთანოლი (4მლ) და თავსდება მდულარე წყლის აბაზანაზე. იქამდე სანამ სპირტი არ ადუღდება, რის შემდეგაც იგი გადაგვაქვს ცინულოვან აბაზანაში.
4. მიღებული ხსნარი ცენტრიფუგირდება 3000rpm, 15წთ
5. მიღებულ ნალექს ემატება 1მლ წყალი, რის შემდეგაც კვლავ ემატება ტოლი მოცულობით სპირტი, დუღდება და კვლავ ცენტრიფუგირდება.
6. მიღებული ნალექი იხსნება 2.5მლ წყალში, რომელიც გადაგვაქვს ცინულოვან აბაზანაში ჩადგმულ სინჯარებში
7. ნიმუშებს ემატება 5მლ ანტრონის ხსნარი
8. სინჯარები ირევა და იდგმევა $90^{\circ}C$, 10წთ და გადაგვაქვს ცინულოვან აბაზანაზე.
9. ამის შემდეგ ხსნარი იზომება 620ნმ -ზე

შედეგები:

გამოთვლა ხდება გლუკოზის სტანდარტული მრუდის მიხედვით. გლიკოგენის შემთხვევაში მიღებული მრუდის მონაცემები მრავლდება კოეფიციენტზე, რომელიც ტოლია 0.9-ს.

§8.1.3 ლაქტატის რაოდენობრივი განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რძემჟავას მარილი (მაგ. კალციუმის, ლითიუმის ან სხვა ნებისმიერი) სტანდარტული ხსნარისთვის
- 2) $\text{n-ოქსიფენილის 1.5\%}$ -იანი ხსნარი
- 3) H_2SO_4 კონცენტრირებული
- 4) CaSO_4 -ის 20% -იანი ხსნარი
- 5) CaSO_4 -ის 4% -იანი ხსნარი
- 6) CaO
- 7) 5% ტრიქლორძმარმჟავა

რეაქციის მსვლელობა:

1. ნიმუშები მუშავდება ტრიქლორძმარმჟავით ცილების გამოსალექად, რის შემდეგაც მიიღება ფილტრატი. აღნიშნული ფილტრატი (2მლ) გადაგვაქვს სინჯარებში
2. ემატება 0.5მლ CaSO_4 -ის 20% -იანი ხსნარი და 0.5გ CaO
3. ნახევარი საათის შემდეგ ცენტრიფუგირდება მაგიდის ცენტრიფუგაზე 10წთ.
4. 0.5მლ სუპერნატანტი გადაგვაქვს ცინულების აბაზანაში განთავსებულ სინჯარებში და ვამატებთ ერთ წვეთ CaSO_4 -ის 4% -იანი ხსნარს
5. ამის შემდეგ ნელნელა, მორევით ვამატებთ 3მლ კონცენტრირებულ გოგირდმჟავას და ვდგავთ მდულარე წყლის აბაზანაზე 5 წთ.
6. 5 წუთის შემდეგ სინჯარები გადაგვაქვს ცინულებზე და ვამატებთ 50მკლ $\text{n-ოქსიფენილის 1.5\%}$ -იან ხსნარს და კვლავ ვდგავთ წყლის აბაზანაზე ახლა უკვე 30°C -ზე 30წთ
7. ამის შემდეგ სინჯარებს ვათავსებთ მდულარე წყლის აბაზანაში ზუსტად 90 წამი
8. გაგრილებულ ხსნარს ვზომავთ 574ნმ -ზე.

შედეგები:

გამოთვლა ხდება რძემჟავას სტანდარტული მრუდის მეშვეობით.

§8.2 გლიკოლიზის შესწავლა

§8.2.1 ჰექსოკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.25 მოლ საქაროზას ხსნარი , რომელიც შეიცავს Tris-HCl 0.005 მოლ ($\text{pH}=7.5$)
 - a. 0.061გ Tris + 25მლ H_2O (pH მივიყვანოთ 7.5-მდე 1 მოლ HCl -ით , ხოლო მოცულობა 100 მლ-მდე წყლით)
 - b. 8.56გ საქაროზა + 100მლ Tris-HCl
- 2) 0.2მოლ Tris-HCl $\text{pH}=7.6$ (2.48 გ Tris / 100 მლ)
- 3) 0.06მოლ ATP (0.33 გ ATP / 10 მლ 0.2 მოლ TRIS-HCL .ნეიტრალიზირდება 30 % - იანი NaOH -ით)
- 4) 0.1მოლ $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.5 გ / 25 მლ)
- 5) 0.005მოლ გლუკოზა (0.01 გ / 10 მლ)
- 6) 0.005მოლ NADP (0.043 გ / 10 მლ)
- 7) გლუკოზო-6-ფოსფატ-დეჰიდროგენაზა (G6PD) 0.3-0.4 E / 0.1 მლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. 10 % - იანი ჰომოგენატი ცენტრიფუგირდება 10 000 RPM, 10 წუთი, 4°C .

რეაქტივი	SAMPLE (მლ)	BLANK (მლ)
TRIS-HCl	1.2	1.2
H ₂ O	0.4	1.0
MgCl ₂	0.3	0.3
NADP	0.3	0.3
ATP	0.3	---
გლუკოზა	0.3	---
G6PD	0.1	0.1

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=340$ ნმ , ფერმენტის აქტივობა გამოითვლება ფორმულით .

$$U = (\Delta A \times V \times K \times 60) / 6.22 \text{ მკმოლ / გ / სთ}$$

სადაც :

ΔA — 1 წუთის მონაცემთა საშუალოა, V- საშუალო მოცულობა (2.9მლ), K — ქსოვილის განზავების კოეფიციენტი.

ფ8.2.2 ფოსფოფრუქტოკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) Tris-HCl 75მმოლ (pH=8.0)
- 2) EDTA 3მმოლ
- 3) მაგნიუმის აცეტატი: $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ 180მმოლ
- 4) ამონიუმის სულფატი: $(NH_4)_2SO_4$ 120მმოლ
- 5) დითიოთრეიტოლი 30მმოლ
- 6) ფრუქტოზო-6-ფოსფატი 30მმოლ (pH = 7.0)
- 7) ATP 30მმოლ (pH = 7.0)
- 8) KCl 1.5მოლ
- 9) NADH 6მმოლ pH = 7.5
- 10) Na - β - გლიცეროფოსფატი 50მმოლ (pH = 8.0)
- 11) ფოსფოენოლპირუვატი 9მმოლ (pH = 7.7)
- 12) პირუვატკინაზა და ლაქტატდეჰიდროგენაზა

რეაქციის მსვლელობა:

1. ფოსფოფრუქტოკინაზას კრისტალიზებული პრეპარატს ხსნიან 50მმოლ Na- β -გლიცეროფოსფატში, რომელიც შეიცავს 0.2მმოლ EDTA + 0.2მმოლ დითიოთრეიტოლი + 0.1მმოლ ATP (pH = 8.0)
2. საცდელ კიუვეტაში შეგვავს 50მმოლ Tris-HCl (pH = 8.0) + 0.1მმოლ EDTA + 1მმოლ დითიო-ტრეიტოლი + 6მმოლ $Mg(CH_3COO)_2$ + 50მმოლ KCl + 4მმოლ $(NH_4)_2SO_4$ + 0.2მმოლ NADH + 1მმოლ ფრუქტოზო-6-ფოსფატი + 1მმოლ ATP + 0.3მმოლ ფოსფოენოლპირუვატი + პირუვატკინაზა (2U/მლ) + ლაქტატ-დეჰიდროგენაზა (2U/მლ).
3. რეაქციას იწყებენ ნიმუშის დამატებით

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 340$ ნმ და ისაზღვრება ოპტიკური სიმკვრივის შემცირება.

§8.2.3 ალდოლაზას აქტივობის განსაზღვრა

§8.2.3.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) გლიცინის ბუფერი 0.1მოლ (pH = 9.0), რომელიც შეიცავს 5მმოლ EDTA -ს
- 2) ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატი 2მმოლ, დამზადებული 0.1მოლ გლიცინის ბუფერზე
- 3) კალიუმის ციანიდი KCN 0.1მოლ, რომელიც შემუავიანებულია pH = 9.0 -მდე
(!!! ციანიდთან მუშაობა ხორციელდება გამწოვის ქვეშ !!!)
- 4) NaOH 2N
- 5) HCl 2N
- 6) ფისკე-სუბაროუს* მეთოდისათვის საჭირო რეაქტივები

რეაქციის მსვლელობა:

1. 4 სინჯარაში შეგვავს 0.1მლ ფრუქტოზოდიფოსფატი და 0.2მლ KCN -ის ხსნარი. ყოველ სინჯარაში 2 წუთიანი ინტერვალით შეგვავს 0.1მლ ნიმუშს.
2. ინკუბაციას პირველ სინჯარაში ვახორციელებთ 30წმ, მეორეში - 60წმ, მესამეში - 90წმ, ხოლო მეოთხეში - 120წმ. რეაქციას, ყოველ ჯერზე, ვაჩერებთ 0.4მლ 2N NaOH -ის დამატებით
3. NaOH -ის დამატების შემდეგ, ვაინკუბირებთ 20წთ, $t=RT^{\circ}C$.
4. ინკუბაციის შემდეგ ვანეიტრალბთ 0.4მლ 2N HCl -ით
5. საკონტროლო სინჯარაში ნიმუშის ნაცვლად შეგვავს გლიცინის ბუფერი.

შედეგები:

შედეგად მიღებულ ხსნარში ისაზღვრება ფოსფორი, ფისკე-სუბაროუს მეთოდით*.

§8.2.3.2 მეთოდი II

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ტრიეთანოლამინის ბუფერი 0.1მოლ (pH = 8.0)
- 2) ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატი 2მმოლ (pH = 8.0)
- 3) ჰიდრაზინი 0.1მოლ (pH = 8.0)
- 4) NaOH 2N
- 5) HCl 2N
- 6) ფისკე-სუბაროუს* მეთოდისათვის საჭირო რეაქტივები

რეაქციის მსვლელობა:

1. 4 სინჯარაში შეგვავს 1მლ ტრიეთანოლამინის ბუფერი + 0.25მლ ფრუქტოზო-1,6-ფოსფატი + 0.25მლ ჰიდრაზინი.
2. ყოველ სინჯარაში 2-3წთ -იანი ინტერვალით შეგვავს 20მკლ ნიმუში
3. ინკუბაციას პირველ სინჯარაში ვახორციელებთ 30წმ, მეორეში - 60წმ, მესამეში - 90წმ, ხოლო მეოთხეში - 120წმ. რეაქციას, ყოველ ჯერზე, ვაჩერებთ 1.5მლ 2N NaOH -ის დამატებით
4. NaOH -ის დამატების შემდეგ, ვაინკუბირებთ 20წთ, $t=RT^{\circ}C$.
5. ინკუბაციის შემდეგ ვანიტრალბთ 1.5მლ 2N HCl -ით
6. საკონტროლო სინჯარაში ნიმუშის ნაცვლად შეგვავს ტრიეთანოლამინის ბუფერი.

შედეგები:

ანალოგიურია მეთოდი I -ის.

§8.2.3.3 მეთოდი III

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ტრიეთანოლამინის ბუფერი 0.1მოლ ($pH=8.0$), რომელიც შეიცავს 5მმოლ EDTA-ს
- 2) ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატი 2მმოლ ($pH = 8.0$)
- 3) NAD^{+} 50მმოლ
- 4) ნატრიუმის არსენატი Na_3AsO_4 50მმოლ
- 5) გლიცერალდეჰიდ - 3 - ფოსფატდეჰიდროგენაზა. (კრისტალიზებურ სუსპენზიას ხსნიან 5მმოლ EDTA-ში ($pH = 7.5$), მანამ, სანამ არ მივიღებთ ხსნარს აქტივობით 10U/0.1მლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. კიუვეტაში შეგვავს 2მლ 0.1მოლ ტრიეთანოლამინის ბუფერი + 30U გლი-ცერალდეჰიდ-3-ფოსფატდეჰიდროგენაზა + 0.2მმოლ ფრუქტოზო-1,6-დიფოს-ფატი + 3მმოლ NAD^{+} + 5მმოლ Na_3AsO_4 (იგულისხმება, რომ ხსნარის 3მლ -მდე შევსების შემდგომ მიიღწევა ზემოთ მითითებული კონცენტრაციები)
2. რეაქციას იწყებენ 30-50მკლ ნიმუშის დამატებით

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 340nm$

8.2.3.4 მეთოდი IV

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატი 20მმოლ ($pH = 7.4$)
- 2) 0.5% $NaHCO_3$
- 3) 560მმოლ ჰიდრაზინსულფატი ($pH = 7.4$)
- 4) 0.1% 2,4-დინიტროფენილჰიდრაზინი (2N HCl-ზე)
- 5) 10% TCA
- 6) 0.3% NaOH

რეაქციის მსვლელობა:

1. მზადდება ნარევი: ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატი: NaHCO_3 : ჰიდრაზინსულფატი : წყალი (1:4:1:2)
2. 0.1მლ ნიმუშს ემატება 0.2მლ ნარევი
3. ინკუბირდება 60წთ, 37°C
4. რეაქცია ჩერდება 0.3მლ 10% TCA-ს დამატებით
5. ცენტრიფუგირება 1500g, 15წთ
6. სუპერნატანტს ემატება 0.5ლ 2,4-დინიტროფენილჰიდრაზინი
7. ინკუბირდება 10წთ, 37°C
8. ემატება 3.5მლ 0.3% NaOH

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{nm}$

*** ფოსფორის განსაზღვრა ფისკე-სუბაროუს მეთოდით**

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ამონიუმის მოლიბდატის $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 2.5% -იანი ხსნარი
- 2) H_2SO_4 5N
- 3) ეიკონოგენი (α -1,2,4-ამინონაფტოლსულფინის მჟავა): რეაქტივის მისაღებად 90°C -მდე გაცხელებულ წყალში იხსნება 15გ NaHSO_3 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) და 10გ Na_2SO_3 . შემდეგ, მუდმივი მორევით ემატება 15გ ეიკონოგენი, იფილტრება ცხელივე; ფილტრატი გრილდება, ემატება 10მლ კონცენ-ტრირებული HCl, ირევა, იფილტრება ბიუნხერის ძაბრით. ნალექი ირეცხება 300მლ 0°C -მდე გაციებული დისტილატით და შემდეგ სპირტით. სპირტით ირეცხება იქამდე, სანამ ფილტრი არ გახდება უფერო. ნალექს აშრობენ სიბნელეში, ჰაერზე და ინახავენ მუქ ჭურ-ჭელში.
- 4) ფოსფატის სტანდარტული ხსნარი (KH_2PO_4) 2მმოლ/მლ. ანტისეპტიკის სახით, ხსნარს ამატებენ რამდენიმე წვეთ ქლოროფორმს.

რეაქციის მსვლელობა:

1. ძირითადი ხსნარის დამზადება: 250მგ ეიკონოგენი + 15გ NaHSO_3 (ან 14გ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) + 0.5გ Na_2SO_3 + 100მლ H_2O . ეიკონოგენი შეიძლება ჩანაცვლდეს ასკორბატით (გვ. 119)
2. სამუშაო ხსნარის დამზადება: 1 ერთეულ ძირითად ხსნარს + 4 ერთეული დისტილირებული წყალი (ხსნარი საჭიროებისამებრ შესაძლოა გაიფილტროს)
3. ხსნარში, რომელიც შეიცავს 0.2-2მკმოლ ფოსფატს, ავსებენ დისტილატით 2.5მლ -მდე და ამატებენ 1.5მლ მოლიბდატის ხსნარს
4. ყველა სინჯარას ემატება 1მლ სამუშაო ხსნარი
5. კარგად მორევის შემდგომ იდგმება წყლის აბაზანაზე, 10-15 წთ, $t = 37^\circ\text{C}$ ან ტოვენებ ოთახის ტემპერატურაზე 30-40წთ.
6. ხსნარს აციებენ და საზღვრავენ $\lambda = 625\text{nm}$

შედეგები:

ფოსფატის შემცველობას სინჯარაში საზღვრავენ საკალიბრაციო გრაფიკით. აღნიშნულისათვის ფოსფორს საზღვრავენ KH_2PO_4 -ის სტან-დარტულ ხსნარში, სხვადასხვა კონცენტრაციით 0.2-2მკმოლ -ის ფარგლებში.

§8.2.4 პირუპატ-დეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.25 მოლ საქაროზას ხსნარი რომელიც შეიცავს 0.005 მოლ Tris-HCl (pH=7.5)
 - a. მზადდება Tris-HCl 0.061გ Tris + 50 მლ H₂O, pH მიგვყავს 7.5 -მდე HCl - ით და ვაცხებთ 100 მლ - მდე წყლით
 - b. 8.56გ საქაროზა + 100 მლ Tris-HCl
- 2) K-ფოსფატის ბუფერი pH=7.4 (PBS)
 - a. 1.18გ Na₂HPO₄ + 100 მლ H₂O
 - b. 0.91გ KH₂PO₄ + 100 მლ H₂O
 - c. 81 მლ Na₂HPO₄ + 19 მლ KH₂PO₄
- 3) MgSO₄ 0.2 მოლ (0.24გ / 10მლ)
- 4) EDTA 0.02 მოლ (0.058გ / 10 მლ)
- 5) ATP 0.06 მოლ (0.152გ / 5 მლ)
- 6) ნატრიუმის პირუვატი 0.4 მოლ (0.352გ / 10 მლ)
- 7) კალიუმის ფეროციანიდი K₃[Fe(CN)₆] 0.0067 მოლ (0.02გ / 9.2 მლ)
- 8) ტრიქლორმარმუატი (TCA) 10% (1გ / 10 მლ)
- 9) TCA 50% (5გ / 10 მლ)

რეაქციის მსვლელობა:

1. საქაროზაზე მზადდება 10 % - იანი ჰომოგენატი

რეაქტივი	SAMPLE (მლ)	BLANK (მლ)
PBS 0.15 M	0.5	0.5
საქაროზა 0.25 M	1.7	1.7
EDTA 0.02 M	0.1	0.1
MgSO ₄ 0.2 M	0.1	0.1
ATP 0.06 M	0.1	0.1
ნატრიუმის პირუვატი 0.4 M	0.1	---
საქაროზა 0.25 M	---	0.1
K ₃ [Fe(CN) ₆] 0.0067 M	0.7	0.7
ჰომოგენატი	0.4	0.4
ინკუბაცია 30 წუთი t=37 °C		
TCA 50 %	0.3	0.3
ცენტრიფუგირება 1500 RPM 15 წუთი		

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=417$ ნმ

გამოთვლა ხდება სტანდარტული მრუდით :

- I. მზადდება 7 სტანდარტული ხსნარი. ძირითადი ხსნარის დასამ-ზადებლად 0.02გ $K_3[Fe(CN)_6]$ იხსნება 9.2 მლ წყალში (=4.66 მკმოლ)

N	H ₂ O (მლ)	ძირითადი ხსნარი (მლ)	$K_3[Fe(CN)_6]$ (მკმოლ)
1	1	1	2.33
2	2	1	1.553
3	3	1	1.165
4	4	1	0.932
5	5	1	0.776
6	6	1	0.665
7	7	1	0.582

- II. 7 სინჯარაში ემატება 3.3 მლ საინკუბაციო არე + 0.7 მლ გრადუირებული ხსნარი + 0.4 მლ საქაროზა + 0.3 მლ TCA

- III. იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=417$ ნმ

ფერმენტის აქტივობა გამოითვლება ფორმულით $[(C'-C'') \times K \times 1000] / (a \times 15)$ (ნმი/მგ/წთ)

სადაც :

C' ფეროციანიდის კონცენტრაცია საკონტროლო სინჯარაში

C'' ფეროციანიდის კონცენტრაცია საცდელ სინჯარაში

K განზავების კოეფიციენტი

a ცილის რაოდენობა სინჯარაში

თავი IX

ნუკლეინის მჟავების შესწავლის მეთოდები

ნუკლეინის მჟავები არიან მაღალმოლეკულური ორგანული ნაერთები, ბიოპოლიმერები, რომლებიც შესდგებიან ნუკლეოტიდური ნაშთებისგან. ნუკლეინის მჟავები დნმ და რნმ არის ყველა ცოცხალი ორგანიზმის უჯრედებში და ასრულებენ უმნიშვნელოვანეს ფუნქციებს, მემკვიდრეობითი ინფორმაციის შესანახვის, გადაცემასა და განხორციელების სახით. დნმ (დებოქსირიბონუკლეინის მჟავა) ემსახურება გენეტიკური ინფორმაციის გრძელვადიან შენახვას, რომელიც დაშიფვრის ინსტრუქციებს, რომლებიც აუცილებელია ტვინის განვითარების, ფუნქციონირებისა და შენარჩუნებისთვის. ეს ინსტრუქციები გადაიწერება რნმ-ში (რიბონუკლეინის მჟავა), რომელიც მოქმედებს როგორც მესინჯერი და რეგულატორი გენეტიკური კოდის ცილებად გადაქცევის პროცესში. პროტეინები, თავის მხრივ, ასრულებენ აუცილებელ ფუნქციებს, როგორცაა ნეიროტრანსმიტერების სინთეზი, სიგნალის გადაცემა და სტრუქტურული მხარდაჭერა ნეირონებში. ეს იმდენად მნიშვნელოვანი ნაერთებია, რომ ზოგიერთი ბიოქიმიკოსი ბიოქიმიას ორ ნაწილად ყოფს, ნიკლეინის მჟავების ბიოქიმია და მათი მომსახურების ბიოქიმია ანუ ყველაფერი დანარჩენი. ტვინში, ნუკლეინის მჟავების მეშვეობით გენის ექსპრესიის ზუსტი რეგულირება გადამწყვეტია ისეთი პროცესებისთვის, როგორცაა ნეიროგანვითარება, სინაფსური პლასტიურობა და მეხსიერების ფორმირება. მაგალითად, სწავლისა და მეხსიერების დროს აქტიურდებიან სპეციფიკური გენები. გარდა ამისა, ნუკლეინის მჟავების მთლიანობა სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანია ტვინის ჯანმრთელობის შენარჩუნებისთვის. დნმ-ის მუტაციამ ან ეპიგენეტიკური მოდიფიკაციამ შეიძლება გამოიწვიოს ტვინის ფუნქციონირებაში ჩართული გენების დისრეგულაცია, რაც ხელს უწყობს ნევროლოგიური და ფსიქიატრიული დარღვევების განვითარებას, როგორცაა ალცჰეიმერის დაავადება, აუტიზმი, შიზოფრენია და დეპრესია. ანალოგიურად, რნმ-ის დამუშავების ცვლილებამ ან არამაკოდირებელი რნმ-ების გაუმართაობამ შეიძლება დაარღვიოს ტვინის ნორმალური აქტივობა და გამოიწვიოს კოგნიტური დეფიციტი ან ნეიროდეგენერაცია. ამრიგად, ტვინში ნუკლეინის მჟავების როლის გაგება გადამწყვეტია ამ დარღვევების საფუძველში მოლეკულური მექანიზმების გამოსავლენად და მიზანმიმართული თერაპიული ინტერვენციების შემუშავებისთვის.

§9.1 ნუკლეინის მჟავების გამოყოფის მეთოდები

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფენოლი pH 6.0 (ნეიტრალიზაცია ხდება NaOH-ით)
- 2) ფენოლი pH 8.3 (ნეიტრალიზაცია ხდება NaOH-ით)
- 3) 0.14მოლ NaCl, რომელიც შეიცავს 0.05მოლ K-ციტრატს
- 4) 100% ეთანოლი

რეაქციის მსვლელობა:

1. 20გ ქსოვილი ჰომოგენიზდება ათმაგ მოცულობა 0.14მოლ NaCl -ში და იფილტრება ორ ფენა მარლაში.
2. ფილტრატს ემატება იმავე მოცულობით ფენოლი (pH 6.0) და ინტენსიურად ირევა 40წთ
3. ამის შემდეგ ხდება ცენტრიფუგირება 600g, 30წთ, 4°C
4. ცენტრიფუგირების შედეგად მიიღება სამი ფრაქცია: ზედა - ინახება რნმ-ის განსაზღვრისათვის, შუა ფრაქციას ემატება ხუთმაგი მოცულობა ფენოლი და NaCl, ინტენსიურად ირევა 40წთ და ცენტრიფუგირდება, ბოლო ფრაქცია კი არ ინახება. მეორე ცენტრიფუგირებით მიღებული ფრაქციებიდან ზედა ფრაქცია ემატება რნმ-ისთვის შენახულ ფრაქციას, ხოლო შუა ფრაქცია გამოიყენება დნმ-ის ანალიზისათვის.

დნმ-ის გამოყოფა:

1. დნმ-ისთვის შენახულ ფრაქციას ემატება ფენოლი (pH 8.3) მოცულობით 10მლ/1გ საწყის ქსოვილზე
2. მიღებული ხსნარი ირევა, ემატება წყალი 1:1 და 30-40 წუთი ინტენსიურად ირევა
3. ამის შემდეგ ხსნარი ცენტრიფუგირდება 600g, 30წთ, 4°C
4. მიღებული სამშრიანი სითხიდან დნმ არის ზედა ფრაქციაში, რომელიც ფრთხილად შორდება და ემატება 2-2.5 ჯერ მეტი მოცულობით ეთანოლი

5. ამის შემდეგ ხსნარი ცენტრიფუგირდება, ნალექი კიდევე ერთხელ ირეცხება ეთანოლით და საბოლოოდ, ხდება ამოშრობა, რითიც მიიღება დნმ-ის მშრალი პრეპარატი.

დნმ-ის გამოყოფა:

1. რნმ-ისათვის შენახულ ფრაქციას ემატება მისი მოცულობის ნახევარი ფენოლი (pH 6.0)
2. მიღებული ხსნარი 30-40 წუთი ინტენსიურად ირევა
3. ამის შემდეგ ხსნარი ცენტრიფუგირდება 600g, 30წთ, 4°C
4. მიღებული ხსნარიდან აიღება ზედა ფრაქცია და ემატება სამმაგი მოცულობით ყინულოვანი ეთანოლი (ეთანოლი 24 საათი თავსდება საყინულეში მინიმუმ -20 გრადუსზე) და ინკუბირდება მაცივარში 1 საათი
5. ამის შემდეგ ხსნარი ცენტრიფუგირდება 3000g, 10წთ, 4°C. მიღებული ნალექი იხსნება მცირე მოცულობით წყალში
6. წყალხსნარი ცენტრიფუგირდება 600g, 10წთ უხსნადი ნაწილაკების მოსაშორებლად
7. მიღებული სუპერნატანტი არის რნმ-ის თხევადი პრეპარატი, რომელსაც შესაძლავს ემატება რამდენიმე წვეთი ტოლუოლი და იყინება -20 ან -80°C-ზე

§9.2 ნუკლეინის მჟავების რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები

§9.2.1 დნმ-ის განსაზღვრის მეთოდი

საჭირო რეაქტივები:

- 5) NaOH 1N
- 6) NaCl - CH₃COOH -ის 20% ხსნარის ნაჯერი ხსნარი
- 7) HClO₄ 0.5N
- 8) ეთანოლი

რეაქციის მსვლელობა:

8. 50-100 მკ ქსოვილს ათავსებენ სინჯარაში, ამატებენ 1მლ 1N NaOH -ს
9. ხსნარს ათავსებენ წყლის აბაზანაზე t = 100°C, 5წთ
10. ჰიდროლიზატს აგრილებენ ოთახის ტემპერატურამდე და შემდეგ ათავსებენ ყინულის აბაზანაზე
11. ამატებენ 0.5მლ 20% -იან ძმარმჟავაზე დამზადებულ NaCl -ის ნაჯერ ხსნარს
12. 3-5 წუთის შემდგომ, ნალექს გამოყოფენ ცენტრიფუგირებით 3000RPM, 5წთ
13. სუპერნატანტი გადააქვთ ახალ სინჯარაში, ხოლო ნალექს ხსნიან 1მლ 1N NaOH -ში
14. შემდეგ კვლავ გამოლექავენ 0.5მლ NaCl -ის დამატებით და ცენტრიფუ-გირებენ 3000RPM, 5წთ.
15. პირველ და მეორე ნალექს აერთიანებენ, ამატებენ ცივ სპირტს (6მლ) და ინკუბირებენ 1-2სთ ოთახის ტემპერატურაზე
16. დნმ -ს იღებენ ცენტრიფუგირებით 3000RPM, 5წთ - ნალექს ემატება 5მლ 0.5N HClO₄
17. სინჯარები, უკუმაცივრით თავსდება მდუღარე წყალში 20წთ

შედეგები:

გაგრილების შემდგომ, ნუკლეინის მჟავებს საზღვრავენ სპექტრო-ფოტომეტრიულად სპირინის ან დიშეს მეთოდით*

* დიშეს მეთოდი

საჭირო რეაქტივები:

- 1) დიშეს რეაქტივი: 1გ დიფენილამინი (ორჯერადად რეკრისტალირებული 70%-იანი ეთილის სპირტიდან) იხსნება 100მლ ყინულოვან ძმარ-მჟავაში და ემატება 2.75მლ კონცენტრირებული H_2SO_4
- 2) დნმ -ის სტანდარტული ხსნარი 0.5მგ/მლ
- 3) $HClO_4$ 0.5N და 1N
- 4) $NaOH$ 0.005N

რეაქციის მსვლელობა:

1. 1-2მლ ქსოვილის ჰიდროლიზატს ემატება დიშეს რეაქტივის ორმაგი მოცულობა
2. ხსნარი ცხელდება წყლის აბაზანაზე, 10წთ, $t = 100^\circ C$
3. საჭიროების შემთხვევაში შესაძლოა ხსნარის განზავება დიშე-წყლის ხსნარით (2:1)

შედეგები:

მიღებული ხსნარი იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 600nm$. დნმ-ის კონცენტრაციის გამოთვლისათვის საჭიროა სტანდარტული მრუდის აგება:

დნმ -ის სტანდარტული ხსნარის დამზადება: დნმ-ი იხსნება 0.005N $NaOH$ -ში, გაანგარიშებით 1მგ/მლ. სტანდარტული ხსნარის დასამზადებლად აღნიშნული ხსნარისა და $HClO_4$ 1N -ის თანაბარ რაოდენობას აცხელებენ 15წთ, $t = 70^\circ C$

ზუსტი კონცენტრაციის გამოსაანგარიშებლად, მიღებულ ხსნარს განა-ზავებენ 50-ჯერ 0.5N $HClO_4$ -ით და ზომავენ სპექტროფოტომეტრიულად

$$\lambda = 270nm \text{ და } \lambda = 290nm$$

დნმ -ის კონცენტრაცია (მკგ/მლ) გამოითვლება ფორმულით:

$$C = [(D_{270} - D_{290}) / 0.19] \times 10.1$$

§9.2.2 დეჰოქსირიბონუკლეინისა (დნმ) და რიბონუკლეინის (რნმ) მჟავას განსაზღვრის მეთოდი

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 10-500მგ ქსოვილს ათავსებენ სინჯარაში
- 2) $NaOH$ 0.005N

რეაქციის მსვლელობა:

1. 10-500მგ ქსოვილს ათავსებენ სინჯარაში
2. ამატებენ 10მლ 0.2N $HClO_4$ -ს
3. ვაცენტრიფუგირებთ 3000RPM, 5წთ (ორჯერადად)
4. ნალექები ერთიანდება და ემატებათ 10მლ 0.5N $HClO_4$
5. ჰერმეტიულად დახურული სინჯარები ინკუბირდება 30წთ, $t = 100^\circ C$
6. ჰიდროლიზატი გრილდება და ცენტრიფუგირდება 3000RPM, 5წთ
7. შემდგომი ანალიზისათვის აიღება სუპერნატანტი

* Blank სინჯარები შეიცავს 0.5N $HClO_4$ -ს

შედეგები:

სუპერნატანტი იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=270\text{nm}$ და $\lambda=290\text{nm}$; დნმ და რნმ -ს საზღვრავენ ფორმულით:

$$C = [(E_{270} - E_{290}) \times K \times V] / 190$$

სადაც:

K დნმ-ისათვის = 10.1 ; რნმ-ისათვის - 10.5; V = მოცულობა

§9.3 ნუკლეინის მჟავების ფრაქციონირების მეთოდები

§9.3.1 დნმ -ის ელექტროფორეზი აგაროზას გელში

§9.3.1.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) TAE ბუფერი
- 2) ულტრასუფთა აგაროზა
- 3) ეტიდიუმის ბრომიდი
- 4) 6 x ჩატვირთვის ბუფერი

რეაქციის მსვლელობა:

1. აგაროზას გელის დამზადება:
 - a. დაამზადეთ 1 x TAE ბუფერი: 20მლ 50 x TAE + 980მლ წყალი
 - b. შეარჩიეთ აგაროზას გელის პროცენტი:

დიაპაზონი	% აგაროზა	აგაროზას რაოდენობა 50მლ გელისათვის
5kb - 60kb	0.3	0.15გ
1kb - 20kb	0.6	0.30გ
500bp - 7kb	0.9	0.45გ
400bp - 6kb	1.2	0.60გ
200bp - 3kb	1.5	0.75გ

- c. დაამატეთ ულტრასუფთა აგაროზას სასურველი რაოდენობა და 1x TAE ბუფერი კოლბაში და შეანჯღრიეთ. სტანდარტული გელისათვის იყენებენ 50მლ 1x TAE ბუფერს.
 - d. მიკროტალღური ინკუბაცია 1 წუთის განმავლობაში. გამოიღეთ და შეანჯღრიეთ. იმ შემთხვევაში, თუ დარჩენილია გაუხსნელი კომპონენტები, გაზარდეთ მიკროტალღური ინკუბაციის დრო. ამის შემდგომ გააგრძელეთ ხსნარი 1 წუთის განმავლობაში.
 - e. დაამატეთ 1მკლ ეტიდიუმის ბრომიდი ხსნარს და შეანჯღრიეთ. (!!! ეტიდიუმის ბრომიდი კანცეროგენია, ამდენად საჭიროა განსაკუთრებული სიფრთხილის გამოჩენა მასთან მუშაობისას!!!)
 - f. მოათავსეთ გელი კასეტაში, დაამაგრეთ სავარცხელი და დაიცადეთ გელის გამაგრებამდე (დაახლოებით 30-40 წთ)
2. მას შემდეგ, რაც გელი გამყარდება მოხსენით სავარცხელი, გადარეცხეთ წყლით და გააშრეთ.

3. მიაქციეთ ყურადღება, რომ გელი განთავსებულია სწორად, ისე, რომ დნმ მოძრაობდეს დადებითი (წითელი) ელექტროდისაკენ.
4. მოამზადეთ ნიმუშები: დაამატეთ თითოეულს ჩატვირთვის ბუფერი. 16 ფოსფორიანი გელისათვის 5მკლ დნმ -ს დაამატეთ 1მკლ 6x ჩატვირთვის ბუფერი. ხოლო 8 ფოსფორიანისათვის 30მკლ დნმ + 6მკლ 6x ბუფერი.
5. შეიტანეთ ნიმუშები შესაბამის ფოსფორში, მოცულობით 5მკლ
6. მოათავსეთ კასეტა და დააფიქსირეთ სახურავი
7. დრო და სიმძლავრე შესაძლოა ვარიირებდეს ნიმუშების თავისებურებიდან გამომდინარე, თუმცა უმეტესობა შემთხვევებისათვის გამოიყენება 90V, 30-50წთ.

შედეგები:

ამის შემდგომ მოხსენით გელი და ინტერპრეტაციისათვის გადაუღეთ მას UV ბოქსის საშუალებით.

§9.3.1.2 მეთოდი II

საჭირო რეაქტივები:

- 1) Faster Better LB
- 2) SYBR Safe
- 3) აგაროზა
- 4) EDTA
- 5) ქსილოციანოლი
- 6) ბრომფენოლის ლურჯი
- 7) გლიცერინი

რეაქციის მსვლელობა:

1. შეარჩიეთ აგაროზას შესაბამისი ხსნარი ცხრილის მიხედვით:

დიაპაზონი	% აგაროზა
1kb - 30kb	0.5
800bp - 12kb	0.7
500bp - 10kb	1.0
400bp - 7kb	1.2
200bp - 3kb	1.5
50bp - 2kb	2.0

2. შეარჩიეთ სამუშაო ბუფერი. ყველაზე გავრცელებულს მიეკუთვნება TAE და Faster Better LB. პირველი მათგანი რელევანტურია 80ვ -მდე ძაბვისათვის, ხოლო მეორე - 275ვ -სათვის.

3. შეარჩიეთ საღებავი დნმ -სათვის. მაგ. ეტიდიუმის ბრომიდი, თუმცა იგი ძლიერი კანცეროგენია, ამიტომ შესაძლოა გამოყენებული იყოს შედარებით უსაფრთხო ვარიანტები, მაგ. SYBR Safe ან Gel Green.
4. ამის შემდეგ საჭიროა ე.წ. ჩატვირთვის ბუფერი დამზადება.

რეაქტივი	რაოდენობა
0.25% ბრომფენოლის ლურჯი	125მგ
0.25% ქსილოციანოლი	125მგ
0.1მლ EDTA	25მლ 0.2მლ EDTA
30% გლიცეროლი (წყალზე)	15მლ
წყალი	10მლ
ჯამური მოცულობა: 50მლ	

5. 250მლ -იან კოლბაში ემატება 0.8გ აგაროზა და 100მლ 1 x Faster better buffer
6. მიკროტალღური ინკუბაცია 1წთ და აურიეთ სრულ გახსნამდე, რისთვისაც დასაშვებია, როგორც ხსნარის გაცხელება, ისე მიკროტალღური ინკუბაციის დროის გაზრდა.
7. შეავსეთ კასეტის 1/3 - 1/2 გელით და მოათავსეთ სავარცხელი.
8. დაელოდეთ გელის სრულ გამყარებას (20-30წთ)
9. დაამზადეთ გელის საღებავი: მაგ. 20მკლ SYBR Safe + 200მლ 1 x Faster Better Buffer
10. მას შემდეგ, რაც გელი გამყარდება მოაცილეთ სავარცხელი და მოათავსეთ საღებავში მინიმუმ 1 სთ, თუმცა დასაშვებია დროის გაზრდა 24 საათამდე.
11. 12მკლ თითოეულ ნიმუშს დაამატეთ 3მკლ 5xBL
12. დააფიქსირეთ სახურავი და გაატარეთ 275ვ დენი 25 წუთის განმავლობაში
13. პროცედურის შემდგომ გაამჟღავნეთ შესაბამისი გამამჟღავნებლით

თავი X

ფერმენტოლოგიური კვლევის საფუძვლები

ფერმენტები, როგორც წესი, არის ცილები, რომლებიც შედგება ერთი ან მეტი პოლიპეპტიდური ჯაჭვისგან, რომლებიც კონფორმირებული არიან კონკრეტულ სამგანზომილებიან სტრუქტურაში. ისინი თავისი ბუნებით ბიოლოგიური კატალიზატორებია, რომლებიც აჩქარებენ ქიმიურ რეაქციებს ცოცხალ ორგანიზმებში ისე, რომ თავად ამ პროცესში არ განიცდიან გარდაქმნას. ისინი გადამწყვეტია სხვადასხვა ფიზიოლოგიური პროცესისთვის, საჭმლის მონელებიდან, დნმ-ის რეპლიკაციამდე. ფერმენტები მუშაობენ რეაქციების გასაგრძელებლად საჭირო აქტივაციის ენერგიის დაქვითვით, რაც ხელს უწყობს სიცოცხლისთვის აუცილებელ რთულ ბიოქიმიურ პროცესებს. ფერმენტის სივრცითი სტრუქტურა აუცილებელია ფერმენტის ფუნქციონირებისთვის, რადგან ის საშუალებას აძლევს ფერმენტს დაუკავშირდეს სპეციფიკურ სუბსტრატის მოლეკულებს. ფერმენტის უბანი, რომელიც იკავშირებს სუბსტრატს, ცნობილია როგორც აქტიური ცენტრი. ფერმენტები მოქმედებენ მექანიზმის მეშვეობით, რომელიც ხშირად აღწერილია როგორც „კლიტე - გასაღების“ მოდელი, სადაც სუბსტრატი ჯდება ფერმენტის აქტიურ ცენტრში, როგორც გასაღები საკეტში. ფერმენტები გადამწყვეტ როლს ასრულებენ თავის ტვინში, სადაც ისინი მონაწილეობენ სხვადასხვა მეტაბოლურ პროცესებში, რომლებიც აუცილებელია თავის ტვინის გამართულად ფუნქციონირებისათვის. ისინი მონაწილეობენ ნეიროტრანსმიტერების სინთეზსა და ტერმინაციის პროცესებში, რაც აუცილებელია სწორი ნეიროტრანსმისიისათვის. მაგალითად, ფერმენტი მონოამინ ოქსიდაზა (MAO) პასუხისმგებელია ისეთი ნეიროტრანსმიტერების დაშლაზე, როგორიცაა სეროტონინი, დოფამინი და ნორეპინეფრინი. ეს ნეიროტრანსმიტერები კრიტიკულია განწყობის რეგულირებისთვის და მათი დონის დისბალანსი ასოცირდება ფსიქიკური დარღვევებთან, როგორიცაა დეპრესია, შფოთვა და შიზოფრენია. ამ ნეიროტრანსმიტერების დონის რეგულირებით, სხვადასხვა ფერმენტები, მათ შორის MAO მონაწილეობას იღებენ ნეიროტრანსმისიის რეგულაციაში და მამასადამე ფსიქიკური ჯანმრთელობის შენარჩუნებაში.

მოლეკულური ფსიქიატრია არის სფერო, რომელიც ცდილობს გაიგოს ფსიქიკის ფუნქციონირების ბიოლოგიური საფუძვლები მოლეკულურ და უჯრედულ დონეზე. ფერმენტები ამ სფეროს ქვაკუთხედიან, რადგან სწორედ ისინი არეგულირებენ იმ ბიოქიმიურ გზებს, რომლებსაც ემყარება ფსიქიკური პროცესებისა და ქცევის თავისებურებანი. გასათვალისწინებელია ისიც, რომ იმის გაგება, თუ როგორ უწყობს ხელს ფერმენტები ფსიქიკური აშლილობის განვითარებასა და პროგრესირებას, შეიძლება საშუალება მოგვცეს ჩამოვაცალიბოთ ამა თუ იმ დაავადების ახალი თერაპიული მიდგომები. მოლეკულურ ფსიქიატრიაში კვლევის ერთ-ერთი მთავარი სფეროა ნეიროტრანსმიტერების მეტაბოლიზმში ჩართული ფერმენტების შესწავლა. მაგალითად, ფერმენტი ტრიპტოფანის ჰიდროქსილაზა (TPH) პასუხისმგებელია სეროტონინის სინთეზის პირველ საფეხურზე. TPH-ის მაკოდირებელი გენის ვარიაციები დაკავშირებულია დეპრესიის და სხვა განწყობის დარღვევების გაზრდილ რისკთან. იმის გაგებას, თუ როგორ მოქმედებს ეს ვარიაციები TPH-ის აქტივობაზე და სეროტონინის დონეზე, შეუძლია ცხადყოს ამ დარღვევების საფუძვლად არსებული მექანიზმები და ხელი შეუწყოს მკურნალობის ახალი მიდგომების ფორმირებას. კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი ფერმენტი მოლეკულურ ფსიქიატრიაში არის კატეჟოლ-O-მეთილტრანსფერაზა (COMT), რომელიც მონაწილეობას იღებს კატეჟოლამინების, მაგალითად დოფამინის გაუვნებელყოფაში. დოფამინი არის ნეიროტრანსმიტერი, რომელიც მონაწილეობს ჯილდოს, მოტივაციისა და კოგნიტურ ფუნქციაში, ხოლო დოფამინის დისრეგულაცია საფუძვლად უდევს ისეთ აშლილობებს, როგორიცაა შიზოფრენია და ყურადღების დეფიციტისა და ჰიპერაქტივობის აშლილობა (ADHD). COMT გენის ვარიანტები, რომლებიც გავლენას ახდენენ ფერმენტების აქტივობაზე, დაკავშირებულია კოგნიტურ ფუნქციასთან და ფსიქიკური აშლილობის რისკთან. ბუნებრივია ენზიმთა ჩამონათვალი ამით არ შემოიფარგლება, თუმცა ეს რამდენიმე მაგალითი ცხადყოფს თუ რაოდენ მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავთ ფერმენტებს ნორმალური თუ პათოლოგიური ფსიქიკური პროცესების წარმართვაში და შესაბამისად თუ რამდენად მნიშვნელოვანია მათი ფუნდამენტური შესწავლა.

§10.1 ფერმენტის კინეტიკური პარამეტრების შესწავლა

ფერმენტების კინეტიკა არის ფერმენტული რეაქციების სიჩქარის შესწავლა. ამ მაჩვენებლებზე გავლენას ახდენს რამდენიმე ფაქტორი, მათ შორის ფერმენტის კონცენტრაცია, სუბსტრატის კონცენტრაცია, ტემპერატურა, pH და ინჰიბიტორების ან აქტივატორების არსებობა. ფერმენტის კინეტიკური პარამეტრების შესწავლისათვის არსებობს ე.წ. მიხაელის-მენტენის განტოლება, რომელიც აღწერს, თუ

როგორაა დამოკიდებული ფერმენტული რეაქციების სიჩქარე სუბსტრატისა და ფერმენტის კონცენტრაციაზე.

მიხელის-მენტენის განტოლება ფუნდამენტური განტოლებაა ფერმენტების კინეტიკაში. იგი აღწერს კავშირს საწყისი რეაქციის სიჩქარეს (v_0) და სუბსტრატის კონცენტრაციას $[S]$ შორის.

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

სადაც:

v_0 - მოცემული რეაქციის სიჩქარეა

$V_{\max}$ - მაქსიმალური სიჩქარე, როცა ფერმენტი გაჯერებულია სუბსტრატით

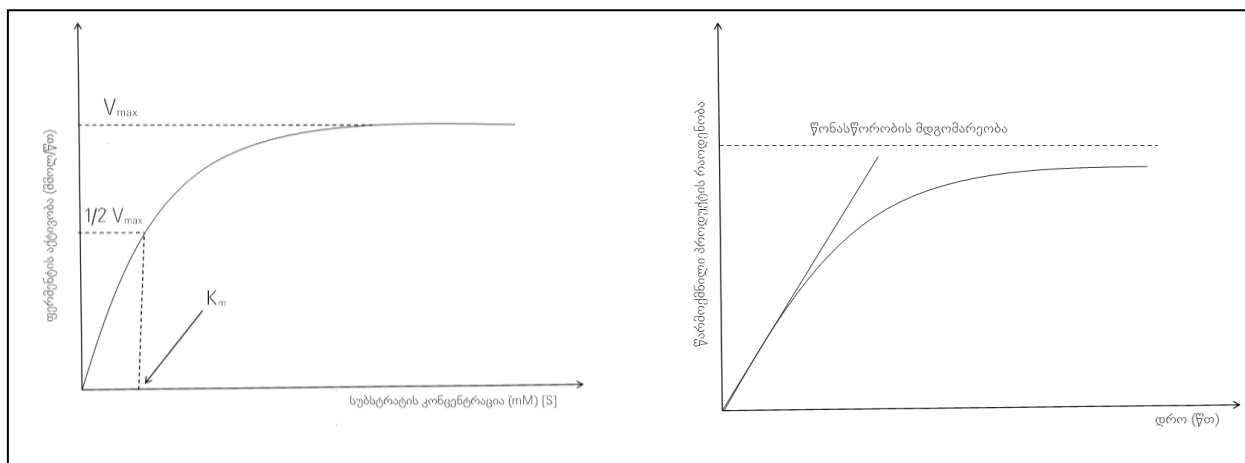
$[S]$ - სუბსტრატის კონცენტრაცია

K_m - მიხელის კონსტანტა, რომელიც აჩვენებს სუბსტრატის კონცენტრაციას, რომლის დროსაც სიჩქარე მაქსიმალურის ნახევარია

ლაინუივერ-ბერკის განტოლება იძლევა მიხელის-მენტენის განტოლების გაწოფივების საშუალებას, მაშასადამე აადვილებს ფერმენტის კინეტიკური პარამეტრების შესწავლას:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

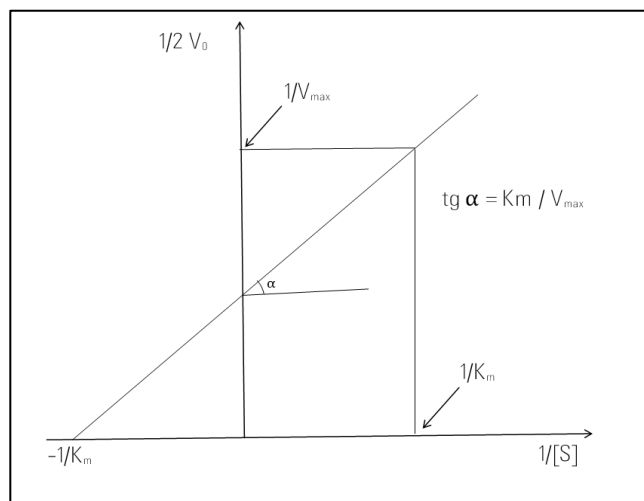
იმ შემთხვევაში, თუ საქმე გვაქვს ერთსუბსტრატიან რეაქციასთან, ამოცანა არც თუ ისე რთულია და გულისხმობს ფერმენტული სიჩქარის დადგენას სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში, შემდეგ კი გრაფიკის აგებასა და მონაცემების დამუშავებას. ხშირად გვხვდება ორ, სამ ან მეტ სუბსტრატიან რეაქციები. ამ დროს ექსპერიმენტის დიზაინი უნდა დაიგეგმოს ისეთგვარად, რომ ერთ-ერთი სუბსტრატის კონცენტრაციის ცვლილებისას უზრუნველყოთ დანარჩენი სუბსტრატების მაქსიმალური გაჯერება. ამასთან, გასათვალისწინებელია, რომ მრავალი ფერმენტის შემთხვევაში ერთი-ერთი სუბსტრატის კონცენტრაცია გავლენას ახდენს დანარჩენი სუბსტრატების თვისობაზე (ანუ K_m -ზე). ასევე მნიშვნელოვანია, რომ ენზიმოლოგიური ექსპერიმენტის დაგეგმვისას გათვალისწინებულ იქნას რამდენიმე მნიშვნელოვანი ფაქტორი. პირველ რიგში ესაა ფერმენტის ოპტიმალური კონცენტრაციის შერჩევა. კონცენტრაცია უნდა იყოს ისეთი, რომ სიჩქარე იყოს პროპორციული დამატებული ცილა-კატალიზატორის კონცენტრაციისა. თუ ურთიერთკავშირი არ ისახება, ეს მიუთითებს პრეპარატში ინჰიბიტორის ან აქტივატორის არსებობაზე. ასევე შესაძლოა ადგილი ჰქონდეს ფერმენტის დისოციაციას რამდენიმე სუბერთეულად, რომლებსაც აქვთ განსხვავებული ფიზიკო-ქიმიური თვისებები. ამასგარდა მნიშვნელოვანია საინკუბაციო პირობების შერჩევა. ეს გულისხმობს ყველა პარამეტრის მუდმივობას, გარდა იმისა, რომელიც შეისწავლება. მაგალითისათვის თუ შეისწავლება pH-ის გავლენა, საჭიროა სუბსტრატის, ტემპერატურის, ბუფერული სისტემის და სხვა ყველა პარამეტრის მუდმივობა გარდა მუჟავიანობისა.



სურათი 7. ფერმენტული რეაქციის კინეტიკური გრაფიკები

§10.2 რეაქციის სიჩქარის სუბსტრატის კონცენტრაციაზე დამოკიდებულების შესწავლა

სუბსტრატისა და რეაქციის ურთიერთ-დამოკიდებულების შეფასებისათვის ტარდება ანალიზის სერია, რომლის დროსაც განისაზღვრება ფერმენტული რეაქციის სიჩქარე სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში. სუბსტრატის კონცენტრაცია იცვლება 0.1K_m -დან 10K_m -მდე. საჭიროა მინიმუმ 6-7 წერტილის აღება და მინიმუმ 3, სასურველია გაცილებით მეტი პარალელური ცდის ჩატარება. აღნიშნულის შედეგად მიიღება გრაფიკი რომელიც წარმოდგენილია სურათი 1A -ზე. V_{max} -ის განსაზღვრისთვის მოსახერხებელია ლაინუივერ-ბერკის განტოლების გამოყენება (იხ. სურათი 8). ასევე მოსახერხებელია შემდეგი სახის განტოლებით სარგებლობაც: $(V_{max}/V_0) - (K_m/[S]) = 1$



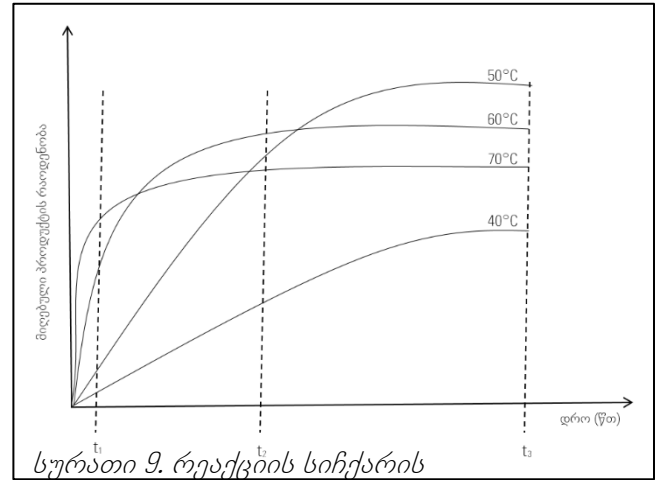
სურათი 8. ლაინუივერ-ბერკის განტოლება

§10.3 რეაქციის სიჩქარის pH-ზე დამოკიდებულების შესწავლა

იმდენად, რამდენადაც K_m და V_{max} შესაძლოა სხვადასხვაგვარად იყვნენ დამოკიდებული pH-ზე, ისეთი ექსპერიმენტებისას, როცა გამოყენებულია სუბსტრატის არაგაჯერებული კონცენტრაცია მიღებული მონაცემები რთულადაა ინტერპრეტირებადი. ამასთან აუცილებლად გასათვალისწინებელია ისიც, რომ სუბსტრატის ერთი და იგივე კონცენტრაცია შესაძლოა გამაჯერებელი იყოს ერთი pH-ის დროს, და არ იყოს ასეთი სხვა pH-ზე. ბუფერის შერჩევისას გასათვალისწინებელია რიგი დეტალები, მაგალითად სასურველია რომ მისი pK იყოს მაქსიმალურად ახლოს რეაქციის pH ოპტიმუმთან. ასევე ყურადსაღებია ის ფაქტიც, რომ ერთი და იმავე pH-ის მქონე სხვადასხვა ბუფერის პირობებში კატალიზური აქტივობა შესაძლოა შეიცვალოს. ამაზე მრავალი ფაქტორი ახდენს გავლენას, მაგალითად ზოგიერთ იონს შესაძლოა ჰქონდეს გამააქტივებელი ან მაინჰიბირებელი გავლენა ფერმენტზე. პოლივალენტური ანიონები (მაგ. ფოსფატები, სულფატები, ციტრატები და ა.შ.) შესაძლოა კონკურირებდნენ უარყოფითად დამუხტულ სუბსტრატთან და გამოიწვიონ რეაქციის ინჰიბირება. ასევე ზოგიერთ კომპონენტს, მაგალითად მაქელატირებელ აგენტებს (მაგ. EDTA), რომლებიც ხშირად გამოიყენება სხვადასხვა ბუფერში, აქვთ უნარი დაიკავშირონ ორვალენტური იონები, რამაც შესაძლოა ასევე გამოიწვიოს რეაქციის ინჰიბირება თუ აღნიშნული იონები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ფერმენტის აქტივაციაში. ასევე გასათვალისწინებელი ნიუანსია იონური ძალა, რომელიც უნდა იყოს მუდმივი, ვინაიდან მასაც გააჩნია უნარი გავლენა მოახდინოს კატალიზურ აქტივობაზე.

§10.4 რეაქციის სიჩქარის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების შესწავლა

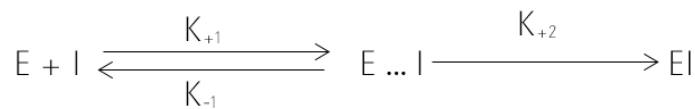
ფერმენტული რეაქციის სიჩქარე დაახლოებით 1.5-2.5 -ჯერ იზრდება ტემპერატურის ყოველ 10°C-ით გაზრდისას. აქედან გამომდინარე არ არსებობს ცნება „ტემპერატურული ოპტიმუმი“ შესახებ. თუმცა არსებობს ტემპერატურული მაქსიმუმი, რომლის შემდეგაც ტემპერატურის ზრდისას ფერმენტის აქტივობა ქვეითდება. ეს უხშირესად დაკავშირებულია ფერმენტის ნაწილობრივ დენატურაციასთან, ამიტომ რაც უფრო მცირეა ტემპერატურული ინკუბაციის დრო, მით უფრო მაღალია „ტემპერატურული ოპტიმუმი“. მაგალითად სურათი 9-ზე ნაჩვენებია, რომ t_1 დროის ერთეულში მაქსიმალური სიჩქარე ფიქსირდება 70°C -ზე, t_1 დროში - 60°C -ზე, ხოლო t_3 დროში, 50°C -ზე. გემოთქმულიდან ცდადია, რომ სწორად დაგეგმულ ექსპერიმენტში აუცილებელია ისეთი პირობების შექმნა, რომ ფერმენტი დარჩეს ნატიურ მდგომარეობაში.



სურათი 9. რეაქციის სიჩქარის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების გრაფიკი

§10.5 ინჰიბიტორების გავლენის შესწავლა

ფერმენტთა სპეციფიკური ინჰიბიტორები ორ დიდ ჯგუფად იყოფა, ესენია: (1) შექცევადი და (2) შეუქცევადი ინჰიბიტორები. მათი შესწავლა დიდ როლს ასრულებს ფერმენტთა კატალიზური აქტივობის, მათი აქტიური და მარეგულირებელი ცენტრების შესწავლის პროცესში. მიღებული მონაცემების ანალიზი კი კიტცისა და ვილსონის მეთოდით ხდება, რომელიც შემდეგ განტოლებას ეფუძნება:

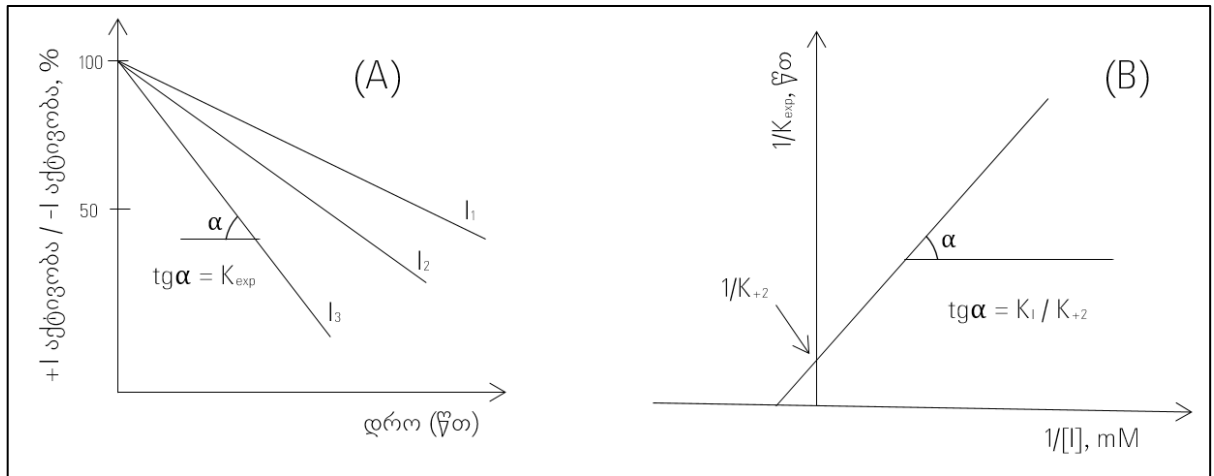


სადაც:

K_{-1} / K_{+1} - შექცევადი ინჰიბიტორ-ფერმენტული კონპლექსის დისოციაციის კონსტანტა (K_i), ხოლო K_{+2} - ფერმენტის შეუქცევადი მოდიფიკაციის სიჩქარის კონსტანტა. კინეტიკური კონსტანტებისა და ინჰიბიტორის კონცენტრაციის შორის დამოკიდებულება გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

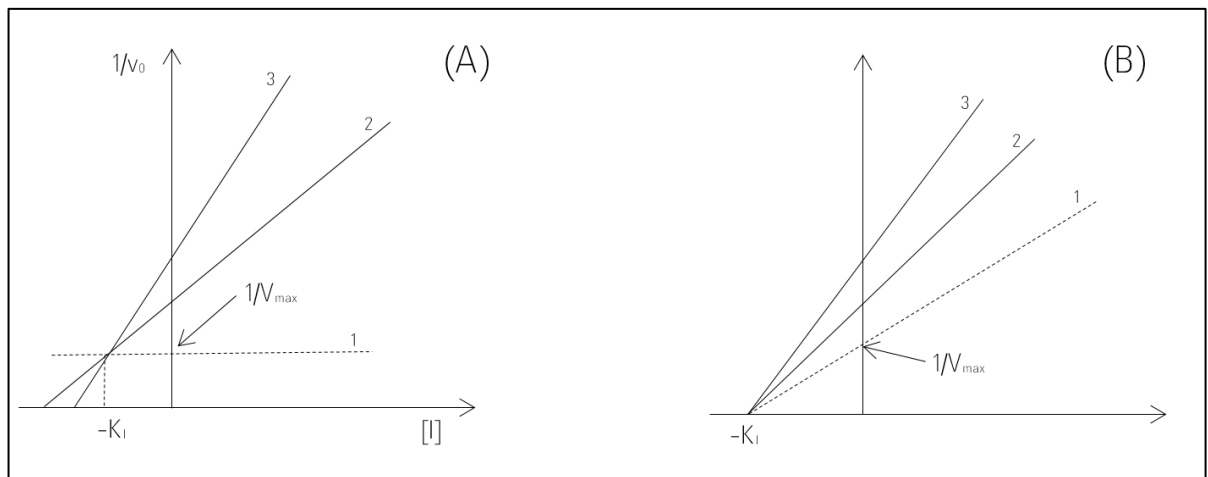
$$1 / K_{\text{Exp}} = 1 / K_{+2} + K_i / K_{+2} \cdot 1 / [I]$$

სადაც K_{Exp} მიიღება ექსპერიმენტული მონაცემებით (იხ. სურ.10A), ხოლო K_i და K_{+2} გამოითვლება მეორეული, ნაწარმოები გრაფიკის მეშვეობით (იხ. სურ.10B)



სურათი 10. კიტსისა და ვილსონის გრაფიკები, სადაც $I_3 > I_2 > I_1$

შექცევადი ინჰიბირება ხასიათდება ფერმენტისა და ინჰიბიტორის წონასწორობით, მათი თვისობის საზომი წონასწორობის კონსტანტაა (K_I). ისეთ შექცევად ინჰიბიტორებს, რომელთა მოქმედებაც ზრდის K_m -ს, ეწოდებათ კონკურენტული ინჰიბიტორები. არაკონკურენტული ინჰიბიტორების დროს K_m არ იცვლება, მაგრამ მცირდება მაქსიმალური სიჩქარე. ამასთან, არსებობენ ინჰიბიტორები, რომლებიც გავლენას ახდენენ როგორც K_m -ზე, ისე V_{max} -ზე. ინჰიბიტორების ტიპისა და K_I -ის გამოსათვლელად გამოიყენება ე.წ. დიკსონის მეთოდი, რომლისთვისაც საჭიროა რეაქციის სიჩქარის გაზომვა სუბსტრატის მუდმივი და ინჰიბიტორის ცვალებადი კონცენტრაციის პირობებში. გრაფიკი იგება როგორც $1/v_0$ -ის დამოკიდებულება ინჰიბიტორის კონცენტრაციაზე ($[I]$) (იხ. სურათი 11)



სურათი 11. დიკსონის გრაფიკები, სადაც (A) გვაჩვენებს კონკურენტულ ინჰიბირებას, ხოლო (B) არაკონკურენტულ ინჰიბირებას. 1,2,3 აღნიშნავს სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციას, სადაც 1 - სუბსტრატის გამაჯერებელი კონცენტრაციაა, ხოლო $S_2 > S_3$.

თავი XI

უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის შესწავლა

უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი ბიოქიმიურ პროცესების ერთობლიობაა, რომლებიც გარდაქმნიან საკვებ ნივთიერებებს ენერგიად, რაც უჯრედს აძლევს საშუალებას შეასრულოს სიცოცხლისთვის აუცილებელი სხვადასხვა ფუნქციები. ეს რთული პროცესი მოიცავს კოორდინირებული რეაქციების სერიას, რომლებიც ხდება უჯრედის სხვადასხვა ნაწილში, ძირითადად ციტოპლაზმაში და მიტოქონდრიაში. უჯრედულ მეტაბოლიზმში ენერგიის ცენტრალური ვალუტა არის ადენოზინტრიფოსფატი (ATP), რომელიც ინახავს და უზრუნველყოფს ენერგიას მრავალი უჯრედული პროცესისთვის. ენერგიის მეტაბოლიზმის პროცესი იწყება გლიკოლიზით, რომელიც ხდება უჯრედის ციტოპლაზმაში. აღნიშნული პროცესი ჩვენ განვიხილეთ მერვე თავში, რომელიც მიეძღვნა ნახშირწყლების შესწავლის მეთოდებს (გვ. 75-83). ასევე ფუნდამენტურ პროცესებს უჯრედთა მეტაბოლიზმში უჭირავს ლიმონმჟავა ციკლს და ჟანგვით ფოსფორილირებას. ყველა ზემოხსენებული პროცესი ხშირადაა ჩართული სხვადასხვა ნეიროფსიქიატრიული მდგომარეობების განვითარებაში. მაგალითად ნანახია, რომ ნეიროდეგენერაციული დაავადებების, ასევე დეპრესიის დროს აღინიშნება ამ პროცესების სარწმუნო შეფერხება და ამდენად ATP-ის წარმოქმნის შემცირება.

§11.1 მიტოქონდრიის ფუნქციური მდგომარეობის შეფასება

მიტოქონდრია საკვანძო როლს თამაშობს უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში, ხშირად ამ ორგანელას „უჯრედის ენერგეტიკულ ქარხანასაც“ კი უწოდებენ ხოლმე. მიტოქონდრიული დისფუნქცია წამყვანია ისედი დაავადებების პათოგენეზში, როგორიცაა მაგალითად პარკინსონის დაავადება. ამდენად, მიტოქონდრიის ფუნქციური მდგომარეობის შეფასება უმნიშვნელოვანესია უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის და საზოგადოდ უჯრედის ფუნქციური მდგომარეობის შეფასებისას.

§11.1.1 მიტოქონდრიის მემბრანის განვლადობის შეფასება

§11.1.1.1 მიტოქონდრიის მემბრანის განვლადობა კალიუმის იონებისათვის

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივები მიტოქონდრიის მისაღებად
- 2) საქაროზა
- 3) ქოლინ-ქლორიდი
- 4) $MgCl_2$
- 5) Tris-HCl
- 6) ვალინომიცინი
- 7) 2,4-დინიტროფენოლი
- 8) $CaCl_2$
- 9) KCl
- 10) ტრიტონ X-100 (10%)
- 11) როტენონი (ეთანოლში)

რეაქციის მსვლელობა:

1. საინკუბაციო არის მომზადება: 0.15მოლ საქაროზა, 75მმოლ ქოლინ-ქლორიდი, 2.5მმოლ $MgCl_2$, 5მმოლ Tris-HCl, pH 7.4.
2. კალიუმ-მგრძნობიარე ელექტროდის კალიბრაცია: 3მლ საინკუბაციო არეს ემატება KCl -ის სხვადასხვა ზუსტი კონცენტრაცია (20-200მკმოლ)

3. 3მლ საინკუბაციო არეს ემატება 0.5მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია (3-5მგ/მლ), 5 მკმოლ როტენონი და აღირიცხება კალიუმის კონცენტრაცია ელექტროდის საშუალებით დაახლოებით 1-2 წუთის განმავლობაში.
4. ამის შემდეგ ხსნარს ემატება ვალინომიცინი კონცენტრაციით 0.15მ/1მგ ცილაზე, რაც ხელს უწყობს კალიუმის იონების შესვლას. აღირიცხება კალიუმის იონების კონცენტრაციის ცვლილება.
5. შემდგომ ხსნარს ემატება 100 მკმოლ 2,4-დინიტროფენოლი, რაც ხელს უწყობს მიტოქონდრიის მატრიქსში არსებული კალიუმის იონების სწრაფ გამოდინებას და მიტოქონდრიაში წყალბადის იონების შედინებას.
6. ენდოგენური კალიუმის რაოდენობას მიტოქონდრიაში საზღვრავენ დეტერგენტის - ტრიტონ X-100 - ის დამატებით საბოლოო კონცენტრაციამდე 0.1%.

შედეგები:

კალიუმის იონების კონცენტრაციის გაანგარიშება ხდება საკალიბრაციო მრუდის დახმარებით.

§11.1.1.2 მიტოქონდრიის მემბრანის განვლადობა ელექტროლიტური ხსნარებისათვის

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივები მიტოქონდრიის მისაღებად
- 2) KCl და NH₄Cl -ის ხსნარები, კონცენტრაციებით: 0.05; 0.10; 0.15; 0.20; 0.25; 0.30; 0.40; 0.50; 0.75; 1.00; 1.25მოლ
- 3) (NH₄)HPO₄ -ის ხსნარები, კონცენტრაციებით: 0.066; 0.133; 0.200; 0.333; 0.500; 0.666; 0.833M
- 4) 0.0012მოლ Tris-HCl (pH 7.2)
- 5) 5x10⁻⁴მოლ როტენონი (ეთანოლში)

რეაქციის მსვლელობა:

1. საინკუბაციო არის მომზადება: 2.5მლ 0.0012მოლ Tris-HCl + 0.3მლ „X“ ხსნარი* + 0.02მლ როტენონი
2. საინკუბაციო არეს ემატება 0.2მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია.

* X ხსნარის ნაცვლად შეგვაქვს KCl -ის, NH₄Cl -ისა და (NH₄)HPO₄ -ის ხსნარები სხვადასხვა კონცენტრაციით.

შედეგები:

შუქშთანთქმა იზომება სპექტროფოტომეტრიულად, 520ნმ სიგრძის ტალღაზე, 1,2 და 3 წუთის შემდეგ.

§11.1.1.3 მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის განვლადობა ანიონებისთვის

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივები მიტოქონდრიის მისაღებად
- 2) KCl, NH₄CNS, NH₄NO₃, CH₃COONH₄, (NH₄)HPO₄, KCNS, CH₃COOK, ამონიუმის სუცინატი, ამონიუმის მალატი, ამონიუმის ციტრატი, ამონიუმის ფუმარატი. 0.6მოლ ხსნარები.
- 3) 0.1 მოლ 2,4-დინიტროფენოლი (pH 7.2)
- 4) ანტიმიცინი A 0.4მგ/მლ (ეთანოლში)
- 5) 0.01მოლ EDTA (pH 7.2)
- 6) 0.06მოლ Tris-HCl (pH 7.2)
- 7) 5x10⁻⁴მოლ როტენონი (ეთანოლში)
- 8) ვალინომიცინი 10⁻⁵მოლ (ეთანოლში)

რეაქციის მსვლელობა:

1. საინკუბაციო არე №1 -ის მომზადება: 2.5მლ 0.006მოლ Tris-HCl + 0.03მლ როტენონი
2. საინკუბაციო არე №1 -ს ემატება 0.3მლ 0.6მოლ KCl, კარგად ირევა და ემატება 0.2მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია (2მგ). რის შემდეგაც იზომება სპექტროფოტომეტრიულად 520ნმ ტალღის სიგრძეზე, 0.5, 1, 2 და 3 წუთის შემდეგ.
3. საინკუბაციო არე №1 -ს ემატება 0.3მლ 0.6მოლ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, კარგად ირევა და ემატება 0.2მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია (2მგ). რის შემდეგაც იზომება სპექტროფოტომეტრიულად 520ნმ ტალღის სიგრძეზე, 0.5, 1, 2 და 3 წუთის შემდეგ. აღიწერება შუქშთანთქმის კლება KCl-თან მიმართებაში.
4. ანალოგიური ცდა კეთდება $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ -ის დამატებით.
5. საინკუბაციო არე №1 -ს ემატება 0.3მლ 0.6მოლ NH_4CNS . ხსნარს ემატება 0.2მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია და იზომება 2 წუთის განმავლობაში ($\lambda=520\text{ნმ}$). შემდეგ ემატება 2,4-დინიტროფენოლი საბოლოო კონცენტრაციით 15მკმოლ და მომდევნო 3 წუთის განმავლობაში იზომება შუქშთანთქმა. პარალელურად იზომება სინჯები დინიტროფენოლის უფრო მაღალი (30, 60, 100, 130მკმოლ) კონცენტრაციების პირობებში. უნდა შეიმჩნეოდეს შუქშთანთქმის კლება დინიტროფენოლის კონცენტრაციის გაზრდისას.
6. ანალოგიური ცდა კეთდება NH_4NO_3 -ის დამატებით.
7. საინკუბაციო არე №1 -ს ემატება 0.3მლ 0.6მოლ KCNS , ემატება მიტოქონდრიები და იზომება 2 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ ემატება ვალინომიცინი და კვლავ იზომება 3 წუთი. აღიწერება შუქშთანთქმის კლება ვალინომიცინის დამატების შემდგომ.
8. საინკუბაციო არე №1 -ს ემატება 0.3მლ 0.6მოლ CH_3COOK , მიტოქონდრიები და იზომება 2 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ ემატება ვალინომიცინი და კვლავ იზომება 2 წუთი. ამის შემდეგ ემატება 2,4-დინიტროფენოლი და კვლავ იზომება 3 წუთის განმავლობაში.
9. საინკუბაციო არე №2 -ის მომზადება: 2.5მლ 0.006მოლ Tris-HCl + 0.03მლ როტენონი + 0.03მლ 0.01მოლ EDTA + 0.03მლ ანტიმიცინი A
10. საინკუბაციო არე №2 -ს ემატება 0.3მლ 0.6მოლ ამონიუმის სუცინატი, მიტოქონდრიები და იზომება შუქშთანთქმა 2 წუთის განმავლობაში. ამის შემდეგ ემატება 2მმოლ $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ და ფიქსირდება შუქშთანთქმის შემცირება 3 წუთის განმავლობაში.
11. ანალოგიური ცდა ტარდება ამონიუმის მაღალი
12. საინკუბაციო არე №2 -ს ემატება 0.3მლ 0.6მოლ ამონიუმის ციტრატი და მიტოქონდრიები, რის შემდეგაც 2 წუთის განმავლობაში იზომება შუქშთანთქმა. შემდეგ ემატება 2მმოლ $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ და მომავალი 2 წუთი კვლავ იზომება შუქშთანთქმა, რის შემდეგაც ემატება 2მმოლ ამონიუმის მაღალი და იზომება შუქშთანთქმა მომავალი 3 წუთი.

შედეგები:

რეაქციის მსვლელობის პირველი 8 ნაბიჯი გვაძლევს ინფორმაციას მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის განვლადობაზე მოცემული ანიონებისადმი, ხოლო უკანასკნელი ოთხი ნაბიჯი - კრებსის ციკლის სუბსტრატების განვლადობის შესახებ.

§11.1.1.4 მიტოქონდრიის კალციუმის მატრანსპორტირებელი სისტემის სპეციფიკურობის შესწავლის მეთოდი pH-მეტრის საშუალებით.

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივები მიტოქონდრიის მისაღებად
- 2) საინკუბაციო არე: 0.15მოლ საქაროზა, 75მმოლ KCl, 2.5მმოლ MgCl_2 და 5მმოლ KH_2PO_4 , pH 7.4 (50მლ)
- 3) 1მოლ K-სუცინატი (pH 7.4)
- 4) 5×10^{-4} მოლ როტენონი (ეთანოლში)
- 5) 10^{-5} მოლ რუტეინის წითელი
- 6) 10^{-1} მოლ CaCl_2 ; SrCl_2 ; MnCl_2 ; BaCl_2
- 7) 10^{-2} მოლ HCl და KOH

რეაქციის მსვლელობა:

1. pH მეტრის კიუვეტაში შეგვავსებთ საინკუბაციო არე, რომელსაც ემატება 10მმოლ სუქცინატი და 5მმოლ როტენონი.
2. ამის შემდეგ ვამატებთ 3-4მგ ცილის შემცველ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას და აღვრიცხავთ წყალბადის იონთა სტაციონარულ კონცენტრაციას.
3. pH მეტრის სტაბილიზაციის შემდეგ კიუვეტაში ვამატებთ 20მკმოლ CaCl_2 -ს და აღვრიცხავთ არის ჟანგვას pH მეტრის სტაბილიზაციამდე.
4. ამის შემდეგ არეს ვამატებთ HCl -სა და KOH-ს, შკალის კალიბრაციისთვის. მნიშვნელოვანია, რომ მინაცემები არ უნდა ემთხვეოდეს კალციუმის დამატებით მიღებულ მონაცემებს. სხვა შემთხვევაში საჭიროა ცილის კონცენტრაციის შემცირება.
5. ვატარებთ ანალოგიურ ცდებს კალციუმისა და სხვა იონთა დამატებით (20-200მკმოლ) და ვაფასებთ სპეციფიკურობას.
6. სპეციფიკურობის შესწავლისთვის საჭიროა ანალოგიური ცდის ჩატარება სხვა იონთა დამატებამდე, კალციუმის გაჯერების პირობებში (10-20მმოლ Ca /მგ ცილა)
7. ბრმა ცდისთვის საჭიროა სინჯარაში რუტენინის წითელის დამატება და მის მახლოკირებელ ეფექტში დარწმუნება.

§11.1.2 მიტოქონდრიის ბარდამავალი ფორის (mPTP) აქტივობა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივები მიტოქონდრიის მისაღებად
- 2) 1მკმოლ ციკლოსპორინი A
- 3) 200მკმოლ KCl
- 4) HEPES Buffer (pH 7.4)

რეაქციის მსვლელობა:

1. 50მკლ ნიმუში + 50მკლ ციკლოსპორინი A + 20მკლ KCl + 80მკლ HEPES
2. იზომება შუქშთანთქმა 540ნმ სიგრძის ტალღაზე

შედეგები:

იზომება წამები, რომლებიც საჭიროა შუქშთანთქმის 0.2U-თი შემცირებისათვის.

§11.1.3 მიტოქონდრიების გაჯირჯების შეფასება

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივები მიტოქონდრიის მისაღებად
- 2) გაჯირჯების ბუფერი: 70მმოლ საქაროზა, 230მმოლ მანიტოლი, 3მმოლ HEPES, 2მმოლ Tris-phosphate, 5მმოლ სუქცინატი, 1 მკმოლ როტენონი

რეაქციის მსვლელობა:

1. მიტოქონდრიული ნალექი რესუსპენზირდება გაჯირჯების ბუფერში (0.5მგ/მლ)
2. იზომება შუქშთანთქმა 550ნმ სიგრძის ტალღაზე, 10წთ

შედეგები:

რაც მეტია გაჯირჯების ხარისხი, მით მეტადაა შემცირებული შუქშთანთქმა.

§11.1.4 სუნთქვის ჯაჭვის პირველი კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივები მიტოქონდრიის მისაღებად
- 2) ნარევი: 25მმოლ KH_2PO_4 (pH 7.4), 120მკლ 50მმოლ DCIP (dichlorophenolindophenol), 100მკლ 1მმოლ ანტიმიცინი A (ეთანოლში), 400მკლ 17.5მმოლ Decylubiquinone (ეთანოლში), მოცემული ხსნარი ივსება 100მლ-მდე დისტილირებული წყლით.
- 3) 70გ/ლ BSA
- 4) 40მმოლ როტენონი (DMSO-ში)
- 5) 10მმოლ NADH

რეაქციის მსვლელობა:

1. 920მკლ ნარევს ემატება 50მკლ BSA და 30მკგ მიტოქონდრიული სუსპენზია.
2. იზომება აბსორბცია 600ნმ სიგრძის ტალღაზე, 1 წუთი
3. კუვეტაში ვამატებთ 2მლ 10მმოლ NADH -ს და ვზომავთ აბსორბციას ყოველ 30წამში, 2.5 წუთი.
4. ვამატებთ DMSO-ში გახსნილ როტენონს და შეგვაქვს ამავე მოცულობით, რის შემდეგაც კვლავ ყოველ 30 წამში ვზომავთ აბსორბციას, ახლა უკვე 3 წუთის განმავლობაში.

შედეგები:

აქტივობა გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$U \text{ (ნმოლ/წთ/მგ)} = \Delta A / \text{წთ} \times 1,000 / (\xi \times V) \times C$$

სადაც:

U - ფერმენტის აქტივობაა [ნმოლ/წთ/მგ]

$\Delta A / \text{წთ}$ - აბსორბციის სხვაობა წუთში

ξ - აბსორბციული კოეფიციენტი DCIP-სთვის და = 19.1

V - გამოყენებული ნიმუშის მოცულობა 1მლ -ზე [მლ]

C - გამოყენებულ ნიმუშში ცილის კონცენტრაცია [მგ/მლ]

§11.1.5 კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ბუფერი: 3.0მმოლ გლიცინ-NaOH + 5.0მმოლ MgSO_4 , pH 9.0
- 2) 10მმოლ კრეატინი გახსნილი ბუფერში
- 3) 3.0მმოლ ATP
- 4) 5% TCA
- 5) 30მმოლ ამონიუმის მოლიბდატისა და 2მმოლ (0.5N HCl-ზე) ამონიუმის ვანადატის ხსნარი (1:1)

რეაქციის მსვლელობა:

1. 100მკლ ნიმუშს ემატება 0.5მლ კრეატინი
2. ინკუბაცია 5წთ, 37°C
3. ემატება ATP
4. ინკუბაცია 20წთ, 37°C

5. რეაქციის შეჩერება ხდება TCA-ს დამატებით
6. მიღებული ხსნარი ცენტრიფუგირდება 10წთ, 3000g
7. 0.5მლ სუპერნატანტს ემატება 0.5მლ ამონიუმის მოლიბდატისა და ვანადატის ხსნარი

შედეგები:

მიღებული ხსნარი იზომება $\lambda=400\text{ნმ}$

§11.2 კრებსის ციკლი

§11.2.1 იზოსიტრატ დეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) K - ფოსფატის ბუფერი 0.5მოლ , pH=7.5 (PBS)
- 2) MgCl_2 1 მოლ
- 3) NADP 100 მმოლ
- 4) იზოციტრატი 1 მოლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. IDH ბუფერის დამზადება (10 მლ) : 200 მკლ PBS + 20 მკლ MgCl_2 + 100 მკლ NADP + 5 მმოლ იზოციტრატი. ხსნარი ივესება 10 მლ -მდე წყლით
2. ჰომოგენატიდან მიიღება მიტოქონდრიული ფრაქცია 15-30მკგ / 20მლ (მიტოქონდრიული ფრაქციის მიღება იხილეთ თავი V-ში, გვ.45-52)
3. მიკროფლანშეტის ფოსოებში შეგვავს 20 – 20 მკლ მიტოქონდრიული ფრაქცია
4. სპექტროფოტომეტრი ყენდება რეჟიმზე: $\lambda=340\text{ ნმ}$, 30 წაკითხვა , 30 წამიანი ინტერვალი , $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$
5. თითოეულ ფოსოს ემატება 200 მკლ IDH ბუფერი და პიპეტით ირევა ორჯერ

შედეგები:

გამოთვლა ხდება შუქშთანთქმების ცვლილებით და გამოისახება საერთაშორისო ერთეულით (U)

§11.2.2 α - კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) HEPES , pH=7.0 / MES , pH=6.0 (50 მმოლ)
- 2) კატალაზა 0.6 მგ / მლ
- 3) DTT 1 მმოლ
- 4) ასკორბინის მჟავა 500 მკმოლ
- 5) FeSO_4 (50 მკმოლ : მზადდება 500 მლ , 20 მმოლ HCl და ზავდება 1 მმოლ -დე წყლით , ცდის წინ)
- 6) α კეტო-გლუტარატი 0.5 მმოლ
- 7) DMSO
- 8) პირუვატ დეჰიდროგენაზა (PDH) 10 მკმოლ
- 9) TCA 5 % და 10%
- 10) Na - ფოსფატის ბუფერი pH=7.2 (50 მმოლ)

- 11) 2,4-DNPH (25 მმოლ : 0.5 მოლ ფოსფორმუჟავაში გახსნის შემდეგ დააყოვნეთ 30-60 წუთი ; განაზავეთ საჭირო კონცენტრაციამდე და გაფილტრეთ)
- 12) NaOH 2მოლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. ჰომოგენატი განაზავეთ DMSO - ში 100მკმოლ - დე
2. მოამზადეთ 5 ეპენდორფის სინჯარა , რომელიც შეიცავს 50 მკლ 10 % - იან TCA -ს და ალნიშნეთ : “0” , “1” , “2” , “5” , “15” წუთი
3. დაამზადეთ კოფაქტორის ხსნარი : HEPES / MES + კატალაზა + DTT + ასკორბინის მჟავა + FeSO₄ + α კეტოგლუტარატი + ჰომოგენატი, მოცულობით 150 მკლ
4. კოფაქტორის ხსნარს დაამატეთ 150 მკლ 20 მკმოლ PDH
5. ვორტექს
6. ინკუბაცია 37 °C შემდეგი თანმიმდევრობით :
 1 წუთზე 50 მკლ გადაგვაქვს “0” სინჯარაში
 2 წუთზე 50 მკლ გადაგვაქვს “1” სინჯარაში
 3 წუთზე 50 მკლ გადაგვაქვს “2” სინჯარაში
 6 წუთზე 50 მკლ გადაგვაქვს “5” სინჯარაში
 16 წუთზე 50 მკლ გადაგვაქვს “15” სინჯარაში
7. გადატანის შემდეგ თითოეული სინჯარა ვორტექსდება და ინახება 4 °C- ზე
8. მიღებული ეპენდორფები ცენტრიფუგირდება 13000 RPM -ზე 15 წუთი
9. მიკროპანშეტის 5 ფოსოში შეგვაქვს 10 მკლ 0.5 მოლ Na-PBS
10. + 90 მკლ სუპერნატანტი , რომელიც მივიღეთ 7- ე საფეხურის შედეგად
11. + 100 მკლ 50 მმოლ 2,4-DNPH
12. ინკუბაცია 20 წუთი t=RT °C
13. +50 მკლ NaOH , ამდენად ჯამური მოცულობა Vt=250 მკლ
14. ინკუბაცია 5 წუთი t=RT °C

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=425$ ნმ და გამოსათვლელად აიგება გრაფიკი, სადაც აბსცისაზე გადაზომილია დრო (წუთი), ხოლო ორდინატაზე აღფა-კეტოგლუტარატის ცვლილება (მმოლ). შესაბამისად, ფერმენტის აქტივობა გამოისახება [მმოლ/წთ] -ში

§11.2.3 სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.16 მოლ საქაროზა
- 2) 0.1 მოლ Tris-HCl (pH=7.5)
- 3) 10 მმოლ NaN₃
- 4) 2-(ρ -იოდოფენილ)-3-(ρ -ნიტროფენილ)-5-ფენილტეტრაზოლიუმი (INT) 4 მგ / მლ
- 5) 0.5 მოლ Na-სუქცინატი
- 6) NaOH
- 7) ეთანოლი (96%)

რეაქციის მსვლელობა:

1. სინჯარაში შეგვავს : 0.10მლ H_2O + 0.05მლ 0.16მოლ საქაროზა + 0.05მლ 0.1მოლ Tris-HCl (pH=7.5) + 0.05მლ 108მოლ NaN_3 + 0.05მლ 8 მმოლ 2-(p-იოდოფენილ)-3-(p-ნიტროფენილ)-5-ფენილტეტრაზოლიუმი , ანუ INT (4 მგ/მლ) + 0.10მლ 0.5მოლ Na-სუქცინატი (წყლით საბოლოო განზავებამდე pH - მიიყვანება 7.5 -მდე NaOH - ით)
 2. ინკუბაცია 1 წუთი $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$
 3. + 0.1 მლ მიტოქონდრიული ფრაქცია
 4. ინკუბაცია 10 წუთი $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$
 5. + 1.5 მლ 95 % - იანი ეთანოლი
 6. კარგად ირევა და ინკუბირდება ყინულოვან აბაზანაზე 10-15 წუთი
 7. ცენტრიფუგირდება 800 g 10 წუთი $t = RT^{\circ}\text{C}$
- * ბლანკში ამოღებულია სუქცინატი
- ** ჰომოგენატის გამოყენების შემთხვევაში ალკოჰოლით ექსტრაქციას მოსდევს ეთილ-აცეტატით ექსტრაქცია (2მლ)

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად, $\lambda = 458\text{ ნმ}$

§11.2.4 ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) TRIS-HCl ბუფერით (pH=8.6)
- 2) 30 მმოლ K- ფოსფატის ბუფერი
- 3) 0.1 მმოლ L-მალატს

რეაქციის მსვლელობა:

1. მიტოქონდრიული სუსპენზია მუშავდება Tris-HCl ბუფერით (pH=8.6), რომელიც შეიცავს 30 მმოლ K-ფოსფატის ბუფერს და 0.1 მმოლ L-მალატს .
2. ინკუბაცია 15 წუთი, $t = RT^{\circ}\text{C}$.
3. ცენტრიფუგირება 3000 g 10 წუთი

შედეგები:

სუპერნატანტი იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 240\text{ ნმ}$, აქტივობა ითვლება U/მგ

§11.2.5 მალაქდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.1მოლ K-ფოსფატის ბუფერი (pH = 7.4)
- 2) 0.006მოლ ოქსალოაცეტატი (მზადდება ცდის წინ 0.1მოლ K-ფოსფატის ბუფერზე. გამოყენებამდე ინახება ყინულის აბაზანაზე, იმდენად, რამდენადაც აღნიშნული რეაქტივი საკმაოდ არასტაბილურია)
- 3) 0,00375მოლ NADH (მზადდება ცდის წინ 0.1მოლ K-ფოსფატის ბუფერზე)

რეაქციის მსვლელობა:

1. უშუალოდ ცდის წინ, ხდება ნიმუშის განზავება 0.1მოლ K-ფოსფატის ბუფერით

2. კიუვეტაში შეგვავს 2.6მლ 0.1მოლ K-ფოსფატის ბუფერი + 0.2მლ NADH + 0.1მლ ოქსალოცეტატი
3. ინკუბირდება 3-4წთ სპექტროფოტომეტრში, რათა განისაზღვროს Blank -ის შუქშთანთქმა
4. ემატება 0.1მლ განზავებული ნიმუში და აღიწერება შუქშთანთქმის ცვლილება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 340\text{ნმ}$ ($\Delta A_{340}/\text{წთ}$) 3-5 წუთის განმავლობაში.

შედეგები:

აქტივობა ითვლება მილიგრამცილაზე ფორმულით:

$$U/\text{მგ} = (\Delta A_{340}/\text{წთ}) / [6.22 \times (\text{მგ}_{\text{enzyme}} / \text{მლ}_{\text{reaction mixture}})]$$

§11.2.6 აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 100 მმოლ Tris-HCl-ის ბუფერზე (pH=7.4) .
- 2) 0.1%-იან ტრიტონ X-100 .
- 3) ნატრიუმის ციტრატი.
- 4) 150 მმოლ Tris-HCl .
- 5) 8.6 მმოლ ცის-აკონიტატი .
- 6) 60 მმოლ MgCl_2 .
- 7) 0.04 U იზოციტრატ დეჰიდროგენაზა .
- 8) 125 მმოლ NADP .
- 9) 240 მმოლ თიაზოლილ ლურჯი ტეტრაზოლიუმ ბრომიდი (MTT) .
- 10) 80 მმოლ ფენაზილ მეტოსულფატი (PMS); pH=8.6)

რეაქციის მსვლელობა:

1. ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის დასადგენად ნატიურ მიტოქონდრიებს ვამუშავებდით ბუფერით, რომელიც შეიცავდა 100 მმოლ Tris-HCl-ის ბუფერზე (pH=7.4) დამზადებულ 0.1%-იან ტრიტონ X-100-ს და ნატრიუმის ციტრატს.
2. მიღებულ ნალექს ვუმატებდით საინკუბაციო არეს (150 მმოლ ტრის-HCl-ის ბუფერზე დამზადებული: 8.6 მმოლ ცის-აკონიტატი, 60 მმოლ MgCl_2 , 0.04 U იზოციტრატ დეჰიდროგენაზა, 125 მმოლ NADP, 240 მმოლ MTT და 80 მმოლ ფენაზილ მეტოსულფატი (PMS); pH=8.6), ვაცოვებდით 15 წთ.
3. ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფუგირებდით ($3000 \text{ g} \times 10'$).

შედეგები:

სუპერნატანტში ცის-აკონიტატის გარდაქმნის პროდუქტს ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=240 \text{ ნმ}$). ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა). კოეფიციენტი $\xi = 0,0313 \text{მგმოლ}^{-1}$

§11.3 ნიკოტინამილური კოფერმენტების განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.05მოლ PBS
- 2) 0.1მოლ სემიკარბაზიდი
- 3) ეთანოლი
- 4) ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა

- 5) 0.1მოლ გლიცინ-გლიცინის ბუფერი
- 6) 0.033მოლ $MgCl_2$
- 7) 0.025მოლ გლუკოზო-ნ-ფოსფატი
- 8) გლუკოზო-ნ-ფოსფატდეჰიდროგენაზა

რეაქციის მსვლელობა:

NAD^+ -ის განსაზღვრა:

1. 1 მლ ნიმუშს, რომელიც ჰომოგენიზებულია 0.5N $HClO_4$ -ში და ნეიტრალიზებულია KOH -ით, ემატება: 1მლ 0.05 PBS, 0.3მლ 0.1მოლ სემიკარბაზიდი, 0.1მოლ ეთანოლი, 0.55მლ წყალი.
2. იზომება შუქშთანთქმა 340ნმ -ზე
3. რეაქცია იწყება 0.05მლ ალკოჰოლდეჰიდროგენაზას დამატებით. აღიწერება შუქშთანთქმის ცვლილება.

$NADH$ -ის განსაზღვრა:

1. 1 მლ ნიმუშს, რომელიც ჰომოგენიზებულია 0.1მოლ Na_2CO_3 -ში ემატება: 0.5მლ 0.1მოლ გლიცინ-გლიცინის ბუფერი, 0.1მლ 0.033მოლ $MgCl_2$, 0.1მლ 0.025მოლ გლუკოზო-ნ-ფოსფატი და 1.25მლ წყალი.
2. იზომება შუქშთანთქმა 340ნმ -ზე
3. რეაქცია იწყება 0.05მლ გლუკოზო-ნ-ფოსფატდეჰიდროგენაზას დამატებით.

§11.4 კრეატიინისა და ფოსფოკრეატიინის განსაზღვრა

§11.4.1 კრეატიინის რაოდენობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.5N $HClO_4$
- 2) 2N KOH
- 3) 1% α - ნაფტოლის ტუტე ხსნარი
- 4) 0.05% დიაცეტილი
- 5) 0.5მკმოლ კრეატიინი (სტანდარტისთვის)

რეაქციის მსვლელობა:

1. მზადდება 1% α - ნაფტოლის ტუტე ხსნარი: ნაფტოლი იხსნება ხსნარში, რომელიც შეიცავს 6გ $NaOH$ -ს და 16გ Na_2CO_3 -ს ყოველ 100მლ წყალზე.
2. მზადდება დიაცეტილის ხსნარი: 1.6გ დიმეთილგლიოქსიმი თავსდება ვიურცის კოლბაში 200მლ გოგირდმჟავასთან ერთად და ცხელდება ქვიშის აბაზანაზე. გროვდება პირველი 50მლ დისტილატი და მიიყვანება 100მლ -მდე წყლით.
3. ნიმუშები მუშავდება $HClO_4$ -ით და ცენტრიფუგირდება, ცილის მოსაშორებლად
4. სუპერნატანტი ნეიტრალიზდება 2N KOH -ით და ცენტრიფუგირდება წარმოქმნილი $KClO_4$ -ის მოსაშორებლად.
5. 1მლ მიღებულ სუპერნატანტს ემატება 1მლ α - ნაფტოლის ხსნარი და 0.5მლ დიაცეტილი.
6. ხსნარი ივსება 2.5მლ -მდე წყლით და ინკუბირდება 30წუთი, ოთახის ტემპერატურაზე, სიბნელეში.
7. მიღებული ხსნარი იზომება სპექტროფოტომეტრიულად, $\lambda=540$ ნმ

შედეგები:

კრეატინის კონცენტრაციის დასათვლელად იგება სტანდარტული მრუდი, კრეატინის სტანდარტული ხსნარის მეშვეობით 0.1-0.5მკმოლ.

§11.4.2 ფოსფორპეპტიდების რაოდენობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) მაგნეზიის ხსნარი: $20\text{გ } \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + 40\text{გ } \text{NH}_4\text{Cl}$ იხსნება 200მლ წყალში და ემატება 20მლ კონცენტრირებული ამიაკი
- 2) ფისკე-სუბაროუს მეთოდისათვის საჭირო რეაქტივები (გვ. 81)
- 3) ფენოლფტალეინი 0.5% (ეთანოლში)

რეაქციის მსგელობა:

1. ნიმუშები მუშავდება HClO_4 -ით და ცენტრიფუგირდება, ცილის მოსაშორებლად
2. 1მლ არაცილოვან ფრაქციას ემატება 1.5მლ მაგნეზიის ხსნარი და ერთი წვეთი ფენოლფტალეინი. ყველაფერი ეს შეტანილია სინჯარებში, რომლებიც დგას ყინულოვან აბაზანაში. რეაქცია უნდა იყოს ტუტე (ვარდისფერი ხსნარი). ამის შემდეგ ხსნარს კარგად ურევინ და ტოვებენ 30-40 წუთი, პერიოდული მორევით. მიიღება უხსნადი ნალექი - ფოსფორმჟავას ამონიუმ-მაგნიუმის მარილი.
3. მიღებულ ხსნარს ფილტრავენ ან აცენტრიფუგირებენ ნალექის მოსაშორებლად
4. სუპერნატანტში საზღვრავენ ფოსფორს ფისკე-სუბაროუს მეთოდით (გვ. 81)

შედეგები:

იხილეთ გვერდი 81

თავი XII

ოქსიდაციური სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა

ოქსიდაციური სტრესი არის დისბალანსი წარმოქმნილ ჟანგბადის რეაქტიულ ფორმების (ROS) რაოდენობასა და ორგანიზმის უნარს შორის გაანეიტრალოს ისინი. მიუხედავად იმისა, რომ ROS უზრეველი სიგნალიზაციის მნიშვნელოვანი კომპონენტია, ამგვარმა დისბალანსმა შეიძლება გამოიწვიოს დაზიანება უზრეველ და მოლეკულურ დონეზე, მათ შორის ლიპიდური პეროქსიდაცია, ცილების დაჟანგვა და დნმ-ის დაზიანება. ჟანგვითი სტრესის როლი სულ მეტად იკვეთება ფსიქიატრიული დარღვევების პათოფიზიოლოგიაში. ტვინი, ჟანგბადის მაღალი მოხმარებითა და ლიპიდების უხვი შემცველობით, განსაკუთრებით დაუცველია ოქსიდაციური სტრესის მიმართ. მოლეკულურ ფსიქიატრიაში ითვლება, რომ ოქსიდაციური სტრესი გადამწყვეტ როლს თამაშობს ფსიქიკური ჯანმრთელობის სხვადასხვა აშლილობის განვითარებასა და პროგრესირებაში, მათ შორის დეპრესია, შიზოფრენია, ბიპოლარული აშლილობა და შფოთვა. ამას ამყარებს მრავალი კვლევა, რომელთაც აჩვენებს ოქსიდაციური მარკერების მაღალი დონე და ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობის დაქვეითება ამ დარღვევების მქონე პირებში. ანტიოქსიდანტური სისტემა, რომელიც მოიცავს ფერმენტულ ანტიოქსიდანტებს, როგორიცაა სუპეროქსიდისმუტაზა (SOD), კატალაზა გლუტათიონ პეროქსიდაზა და რედუქტაზა, ისევე როგორც არაფერმენტული ანტიოქსიდანტები, როგორიცაა ვიტამინი C, ვიტამინი E და გლუტათიონი, წარმოადგენენ უზრეველი ოქსიდაციური სტრესისგან დამცავ მექანიზმს. ეს ანტიოქსიდანტები ანეიტრალავენ ROS-ს, რითაც იცავენ უზრეველ ჟანგვითი დაზიანებისგან. ფსიქიატრიული აშლილობების კონტექსტში, ანტიოქსიდანტური სისტემის დაზიანებამ შეიძლება გააძლიეროს ოქსიდაციური სტრესის ეფექტი, რაც ხელს უწყობს ნეირონების დისფუნქციას და ნეირონთბას, რაც მრავალი ფსიქიატრიული მდგომარეობის ძირითადი მახასიათებელია. მაგალითად, გლუტათიონის შემცირებული დონე შეინიშნება შიზოფრენიისა და ბიპოლარული აშლილობის მქონე პაციენტებში. ბოლო პერიოდში ჩნდება შრომები, რომლებიც ვარაუდობენ, რომ ოქსიდაციურ სტრესზე მიმართული თერაპია შესაძლოა ნოვატორული და ეფექტური მიგნება აღმოჩნდეს ფსიქიატრიული აშლილობების სამკურნალოდ. მაგალითად ისეთი ანტიოქსიდანტებით მკურნალობამ, როგორიცაა N-აცეტილცისტეინი (NAC), რომელიც ზრდის გლუტათიონის დონეს, დადებითი ეფექტები აჩვენა კლინიკურ კვლევებში ისეთი დარღვევების სამკურნალოდ, როგორიცაა შიზოფრენია, ბიპოლარული აშლილობა და დეპრესია. ამდენად ჩანს, რომ ანტიოქსიდანტური სისტემისა და ჟანგვითი სტრესის კვლევა უმნიშვნელოვანესია ფსიქიატრიული თუ ნევროლოგიური დარღვევის შესწავლისას.

§12.1 სუპეროქსიდისმუტაზას (SOD) აქტივობის განსაზღვრა

§12.1.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A
 - a. EDTA - 0.33მმოლ (6.15მგ/50მლ Buffer I)
 - b. PMS - 0.09მმოლ (1.5მგ/50მლ Buffer I)
 - c. Nitroblue Tetrazolium (NBT) - 0.407მმოლ (17მგ/50მლ Buffer I)
 - d. Buffer I - $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ფოსფატის ბუფერი (PB), 0.1მოლ pH=7.8
- 2) რეაქტივი B
 - a. NADH - 1მმოლ (2მგ/2.5მლ Buffer II)
 - b. Buffer II - Tris-HCl, 25მმოლ, pH=8.0

რეაქციის მსვლელობა:

1. 0.95მლ Buffer I + 0.05მლ ჰომოგენატი + 2მლ რეაქტივი I
2. იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{nm}$
3. ემატება 0.1მლ რეაქტივი II
4. ინკუბაცია 20წთ, $t = RT^\circ\text{C}$
5. იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{nm}$

* Blank სინჯარაში ჰომოგენატი ჩანაცვლებულია Buffer I -ით, ანუ შეიცავს: 1მლ Buffer I + 2მლ რეაქტივი I + 0.1მლ რეაქტივი II

შედეგები:

$$T = [(E_{20'} - E_{0'} - E_{\text{Blank}}) / E_{\text{Blank}}] \times 100\%$$

$$A = T\% / 100 - T \text{ (U/მგ)}$$

სადაც:

A - ფერმენტის აქტივობა

$E_{0'}$ - პირველი გაზომვით მიღებული შუქშთანთქმვა

$E_{20'}$ - მეორე გაზომვით მიღებული შუქშთანთქმვა

§12.1.2 მეთოდი II (მიკროპლანშეტისთვის)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A
 - a. EDTA - 0.33მმოლ (6.15მგ/50მლ Buffer I)
 - b. PMS - 0.09მმოლ (1.5მგ/50მლ Buffer I)
 - c. Nitroblue Tetrazolium (NBT) - 0.407მმოლ (17მგ/50მლ Buffer I)
 - d. Buffer I - $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ფოსფატის ბუფერი (PB), 0.1M, pH=7.8
- 2) რეაქტივი B
 - a. NADH - 1მმოლ (2მგ/2.5მლ Buffer II)
 - b. Buffer II - Tris-HCl, 25მმოლ, pH=8.0

რეაქციის მსვლელობა:

რეაქტივი	Blank	Sample
ჰომოგენატი	---	10მკლ
Buffer I	100მკლ	90მკლ
რეაქტივი A	200მკლ	200მკლ
იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{nm}$		
რეაქტივი B	10მკლ	10მკლ
ინკუბაცია 20წთ, $t = RT^\circ\text{C}$		
იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{nm}$		

§12.1.3 მეთოდი III

საჭირო რეაქტივები:

- 1) საინკუბაციო არე (3მლ) - შეიცავს ნიტროლურჯ ტეტრაზოლიუმს (0.41მმოლ); EDTA (0.33მმოლ); მეთილფენაზოლსულფატი (0.01მმოლ, pH=8.3)
- 2) NADH (0.8მმოლ)

რეაქციის მსვლელობა:

1. საინკუბაციო არეს, მოცულობით 3მლ, ემატება 0.02მლ ჰომოგენატი.
2. მიღებული იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{nm}$
3. ემატება 0.1მლ NADH

4. ინკუბირდება 20წთ, $t=37^{\circ}\text{C}$
5. კვლავ იზომება $\lambda = 540\text{ნმ}$

შედეგები:

$$T = [(E_{0'} - E_{20'} / E_{20'}) \times 100\%$$

$$A = T\% / 100 - T \text{ (U/მგ)}$$

სადაც:

$E_{0'}$ - პირველი გაზომვით მიღებული შუქშთანთქმაა

$E_{20'}$ - მეორე გაზომვით მიღებული შუქშთანთქმაა

A - ფერმენტის აქტივობა

§12.1.4 მეთოდი IV (დაფუძნებული კვერციტინის ჟანგვის ინჰიბიციაზე)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) NaCl (0.9%)
- 2) PBS (0.1M; pH = 7.6)
- 3) EDTA (0.05მოლ ანუ 18.6მგ/100მლ H_2O)
- 4) TEMED (0.005მოლ დამზადებული 0.05მოლ EDTA-ზე)
- 5) კვერციტინი (0.5მოლ დამზადებული DMSO-ზე ანუ 3მგ/20მლ)
- 6) ლაქტოფერინი (1%)

რეაქციის მსვლელობა:

1. დავამზადოთ ქსოვილის 10%-იანი ჰომოგენატი ფოსფატის ბუფერზე და ამავე ბუფერით განვაზაოთ 500-ჯერ
2. საცდელ სინჯარაში შეგვავსებ 0.5მლ PBS + 0.5მლ TEMED + 0.1მლ ჰომოგენ.
3. დავამატოთ 0.1მლ კვერციტინი და უმაღლეს გავზომოთ $\lambda = 406\text{ნმ}$
4. ინკუბაცია 20წთ, $t=RT^{\circ}\text{C}$
5. კვლავ გავზომოთ $\lambda = 406\text{ნმ}$

* Blank სინჯარაში ნაცვლად ჰომოგენატისა შეგვავსებ 0.1მლ NaCl (0.015M)

§12.1.5 მეთოდი V

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A
 - a. PBS (pH = 8.5; 50მმოლ)
 - b. ნიტროლურჯი ტეტრაბოლიუმი (NBT) - 1მმოლ (წყალზე)
 - c. NADH - 1მმოლ (PBS -ზე)
- 2) რეაქტივი B (ცდის წინ ბავდება 1000 -ჯერ)
 - a. PMS - 0.1მმოლ (წყალზე)

რეაქციის მსვლელობა:

1. მზადდება 10% -იანი ჰომოგენატი (100მმოლ PBS, pH = 7.0 + 2მმოლ EDTA)
2. ჰომოგენატი ცენტრიფუგირდება 4000RPM; 15წთ; 4°C . გამოიყენება სუპერნატანტი

რეაქტივი	Blank	Sample
რეაგენტი A	1.0მლ	1.0მლ
სუპერნატანტი	---	0.1მლ
წყალი	0.1მლ	---
შეიკინგი 1წთ, $t=RT^{\circ}C$		
რეაგენტი B	0.1მლ	0.1მლ
იზომება $\lambda = 560nm$, 5 წუთიანი ინტერვალით		

შედეგები:

$$\%Inhibition = [(\Delta E_{Blank} - \Delta E_{Sample}) / \Delta E_{Blank}] \times 100$$

$$A = \% Inhibition \times 3.75 \text{ U/მლ}$$

ან

$$A = \% Inhibition \times 3.75 \times 1/g \text{ (გამოყენებული ქსოვილი) U/g}$$

სადაც:

ΔE - შუქშთანთქმის სხვაობა

§12.2 კატალაზას (CAT) აქტივობის განსაზღვრა

§12.2.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) წყალბადის ზეჟანგი (H_2O_2) - 0,03%
- 2) ამონიუმის მოლიბდატი $((NH_4)_6Mo_7O_{24})$ - 4%

რეაქციის მსვლელობა:

1. 0.1მლ ჰომოგენატი + 2მლ H_2O_2
2. ინკუბაცია 10წთ, $t=RT^{\circ}C$
3. +1მლ ამონიუმის მოლიბდატი
4. ცენტრიფუგირება 10წთ

* Blank სინჯარაში ჰომოგენატი ჩანაცვლებულია 0.1მლ წყლით

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda = 410 \text{ nm}$. ფერმენტის აქტივობა გამოითვლება ფორმულით: $A = [(E_{Blank} - E_{Sample}) \times 60] / 22.2$

სადაც, 22.2 - წყალბადის ზეჟანგის შუქშთანთქმის კოეფიციენტი

§12.2.2 მეთოდი II (მიკროპლანშეტისთვის)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) წყალბადის ზეჟანგი (H_2O_2) - 0,03%
- 2) ამონიუმის მოლიბდატი $((NH_4)_6Mo_7O_{24})$ - 4%

რეაქციის მსვლელობა:

რეაქტივი	Blank	Sample
ჰომოგენატი	---	50მკლ
H ₂ O ₂	1მლ	1მლ
H ₂ O	50მკლ	---
ინკუბაცია 10წთ, t=37°C		
ამონიუმის მოლიბდატი	500მკლ	500მკლ

შედეგები:

ანალოგიურია მეთოდი I -ის

§12.2.3 მეთოდი III

საჭირო რეაქტივები:

- 1) წყალბადის ზეჟანგი (H₂O₂) - 30 მმოლ (PBS -ზე)
- 2) ფოსფატის ბუფერი (PBS) - 50მმოლ, pH = 7.0 (889მგ Na₂HPO₄/100მლ H₂O)

რეაქციის მსვლელობა:

რეაქტივი	Blank	Sample
PBS	510მკლ	500მკლ
H ₂ O ₂	500მკლ	500მკლ
ჰომოგენატი	---	10მკ

ცხრილზე ასახული პროცედურის შემდგომ, ხდება გაზომვა სპექტრო-ფოტომეტრიულად $\lambda = 240\text{ნმ}$, 2 წთ-ის განმავლობაში

შედეგები:

ფერმენტის აქტივობა $U = (\Delta E / \text{წთ}) / EC \times T_v / S_v \times DF$

სადაც:

U - კატალაზას აქტივობაა მილიგრამ ცილაზე

ΔE - შუქშთანთქმათა სხვაობა

EC = 0,0436 მკლ

T_v - ჯამური მოცულობა, = 1010 მკლ

S_v - ნიმუშის მოცულობა, = 10მკლ

DF = 501 x 2

§12.2.4 მეთოდი IV

საჭირო რეაქტივები:

- 1) წყალბადის ზეჟანგი (H₂O₂) - 0.065მოლ (PBS -ზე)
- 2) ფოსფატის ბუფერი (PBS) - 60მმოლ, pH = 7.4 (11გ Na₂HPO₄ + 2გ KH₂PO₄ + 1ლ H₂O; pH მიიყვანება 1მოლ HCl -ით)
- 3) ამონიუმის მოლიბდატი ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O) - 32.4 მმოლ (40.04გ /1ლ H₂O)

რეაქციის მსვლელობა:

- ყველა რეაქტივი თბება 37°C -მდე

რეაქტივი	Sample (მკლ)	Blank ₁ (მკლ)	Blank ₂ (მკლ)	Blank ₃ (მკლ)
ჰომოგენატი	50	50	---	---
H ₂ O ₂	1000	1000	1000	---
PBS	---	---	50	1050
ა. მოლიბდატი	---	1000	1000	1000
ინკუბაცია 1წთ, t=37°C				
ა. მოლიბდატი	1000	---	---	---
იზომება $\lambda = 240\text{nm}$				

შედეგები:

ფერმენტის აქტივობა $U = [(E_{\text{Blank1}} - E_{\text{Sample}}) / (E_{\text{Blank2}} - E_{\text{Blank3}})] \times 271$

§12.2.5 მეთოდი V

საჭირო რეაქტივები:

- წყალბადის ზეჟანგი (H₂O₂) - 10.5მმოლ (PBS -ზე)
- ფოსფატის ბუფერი (PBS) - 50მმოლ, pH = 7.0 (889მგ Na₂HPO₄/100მლ H₂O)

რეაქციის მსვლელობა:

- სამუშაო ხსნარი მოცულობით 1მლ, შეიცავს: 50მმოლ PBS + 10.5მმოლ H₂O₂
- რეაქციის ინიცირება ხდება 75მკლ სუპერნატანტის დამატებით, რომელიც წინასწარ მიირება 10% - იანი ჰომოგენატის ცენტრიფუგირებით, 650g -ზე, 10წთ.
- იზომება დრო, რომელიც საჭიროა შუქშთანთქმის 0.450-დან 0.400-მდე შემცირებისათვის, pH = 7.0, $\lambda = 240\text{nm}$

შედეგები:

ფერმენტის აქტივობა იზომება ე.წ sigma unit -ში:

$U = 1\text{მკმოლ H}_2\text{O}_2/\text{წთ.}$

(ამ დროს H₂O₂ -ის კონცენტრაცია მცირება 10.3მმოლ -დან 9.2მმოლ -მდე).

§12.2.6 მეთოდი VI

საჭირო რეაქტივები:

- ფოსფატის ბუფერი (PBS) - 50მმოლ, pH = 7.0
 - 6.81გ KH₂PO₄ + 1000მლ H₂O
 - 6.9გ Na₂HPO₄ + 1000მლ H₂O
 - 390მლ “a” + 610მლ “b”
- წყალბადის ზეჟანგი (H₂O₂) - 30მმოლ (PBS -ზე)

რეაქციის მსვლელობა:

1. კიუვეტაში შეგვავს 0.1მლ ჰომოგენატი + 1.9მლ PBS
2. ვამატებთ წყალბადის ზეჟანგს და უმაღლ ვზომავთ $\lambda = 240\text{ნმ}$, ჯერ $t_1 = 15\text{წმ}$; შემდეგ $t_2 = 30\text{წმ}$

რეაქტივი	Sample	Blank
ჰომოგენატი	0.1მლ	0.1მლ
PBS	1.9მლ	2.9მლ
H ₂ O ₂	1მლ	---
წყალბადის ზეჟანგის დამატებისთანავე ვზომავთ $\lambda = 240\text{ნმ}$, ჯერ $t_1 = 15\text{წმ}$; შემდეგ $t_2 = 30\text{წმ}$		

შედეგები:

$$K = (V_t / V_s) \times (2.3 / \Delta t) \times (\log E_{15''} / E_{30''}) \times 60 \text{ U/მგ}$$

სადაც:

V_t - საერთო მოცულობა (3მლ)

V_s - ნიმუშის მოცულობა (0.1მლ)

$$\Delta t = t_2 - t_1 = 15\text{წმ}$$

K - რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა

§12.3 გლუტათიონპეროქსიდაზას (GSH-Px) აქტივობის განსაზღვრა

§12.3.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფოსფატური ბუფერი (0.3 მოლ ; pH=7.4)
- 2) Na₃N (12 მმოლ)
- 3) EDTA (6 მმოლ)
- 4) გლუტათიონი (2.5 მმოლ)
- 5) H₂O₂ (1.8 მმოლ)
- 6) ტრიქლორძმარმჟავა

რეაქციის მსვლელობა:

1. 0.2 მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია + 1 მლ ფოსფატის ბუფერი, რომელსაც დამატებული აქვს 12მმოლ Na₃N და 6 მმოლ EDTA + 0.5 მლ გლუტათიონი + 0.5 მლ H₂O₂
2. H₂O₂ - ის დამატებიდან 2 წუთის შემდეგ ემატება 10% -იანი ტრიქლორ-ძმარმჟავა, მოცულობით 1მლ
3. ცენტრიფუგირება 3000 RPM, 15 წუთი

შედეგები:

სუპერნატანტი იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=340\text{ნმ}$

§12.3.2 მეთოდი II

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A (ბუფერი, pH= 7.0)
 - a. ფოსფატური ბუფერი 50 მმოლ
 - b. ტრიტონ X-100 0.1%
- 2) რეაქტივი B (NADPH)
 - a. გლუტათიონი 24 მმოლ
 - b. გლუტათიონრედუქტაზა ≥ 12 U
 - c. NADPH 4.8 მმოლ
- 3) რეაქტივი C (0.3 %)

რეაქციის მსვლელობა:

1. ცივ ბუფერზე (მაგ. 50მმოლ ფოსფატის ბუფერი pH=7.0 + 5მმოლ EDTA) დამ-ზადებული ჰომოგენატი ცენტრიფუგირდება 4000RPM, 10-20 წუთი, 4°C, სუპერნატანტის მისაღებად
2. სინჯარაში შეგვავს: 1მლ რეაქტივიA + 0.1მლ რეაქტივიB + 0.01მლ სუპერნატანტი + 0.1მლ რეაქტივი C

შედეგები:

3 წუთის განმავლობაში იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=340$ ნმ. ფერმენტის აქტივობა გამოიანგარიშება ფორმულით

$$A(U/g) = [(A/\text{წთ}) / 0.00622] \times 121$$

სადაც:

$$1 \text{ mU/მლ} = 1 \text{ ნმოი NADPH} / \text{წთ} / \text{მლ}$$

$$0.05 \leq A \leq 1,5$$

§12.3.3 მეთოდი III

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფოსფატის ბუფერი (PBS) 75 მმოლ (pH7.0)
- 2) გლუტათიონრედუქტაზა (GSR) 60 მმოლ
- 3) ნატრიუმის აზიდი (NaN_3) 0.12 M
- 4) Na_2EDTA 0.15 მმოლ
- 5) NADPH 3 მმოლ
- 6) H_2O_2 7.5 მმოლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. 3 მლ - იან კიუეტაში შეგვავს : 2.0 მლ ფოსფატის ბუფერი + 50 მკლ გლუტათიონრედუქტაზა + 50 მკლ NaN_3 + 0.1 მლ Na_2EDTA + 0.1 მლ NADPH + 0.1 მლ ჰომოგენატი
2. მიღებული ხსნარი ივსება 2.9 მლ - მდე ბიდისტილირებული წყლით
3. რეაქცია იწყება 100 მკლ H_2O_2 - ის დამატებით

რეაქტივი	SAMPLE	BLANK
BPS	2.0 მლ	2.0 მლ
GSR	0.05 მლ	0.05 მლ
NaN ₃	0.05 მლ	0.05 მლ
Na ₂ EDTA	0.1 მლ	0.1 მლ
NADPH	0.1 მლ	0.1 მლ
სუპერნატანტი	0.1 მლ	0.1 მლ
H ₂ O ₂	0.1 მლ	---
ბიდიისტილატი	0.5 მლ	0.6 მლ

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=340$ ნმ , ყოველ 1 წუთში , 5 წუთის განმავლობაში .

§12.4 გლუტათიონრედუქტაზას (GR) აქტივობის განსაზღვრა

§12.4.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფოსფატის ბუფერი (PBS) 0.05 მოლ (pH=8.0)
- 2) EDTA 1 მმოლ .
- 3) დაჟანგული გლუტათიონი (GSSG) 7.5 მმოლ .
- 4) NADPH 1.2 მმოლ .

რეაქციის მსვლელობა:

1. 0.2 მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია + 2 მლ PBS , რომელსაც დამატებული აქვს 0.2 მლ EDTA + 0.5 მლ GSSG + 0.1 მლ NADPH .
2. ინკუბაცია $t=37^{\circ}\text{C}$ 10 წუთი .

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=340$ ნმ.

§12.4.2 მეთოდი II

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A
 - a. კალიუმისფოსფატის ბუფერი 100 მმოლ (pH=7.5)
 - b. EDTA 1მმოლ
- 2) რეაქტივი B – დაჟანგული გლუტათიონი (GSSG) 50მმოლ
- 3) რეაქტივი C – NADPH 2მმოლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. PBS -ში ჰომოგენიზირებული ქსოვილის ცენტრიფუგირება 4000 RPM, 20 წუთი, 4°C, სუპერნატანტის მისაღებად
2. 0.05მლ სუპერნატანტი + 1მლ რეაქტივი A + 0.1მლ რეაქტივი B + 0.1მლ რეაქტივი C

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=340$ ნმ, ყოველ 1 წუთში, 5 წუთის განმავლობაში. ფერმენტის აქტივობა გამოითვლება ფორმულით:

$$A(U/L) = 4019 \times \Delta A \text{ ნმ/წთ } (A \leq 10U/L)$$

§12.4.3 მეთოდი III

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფოსფატის ბუფერი (PBS) (0.3M, pH = 6.5)
- 2) EDTA (0.25M)
- 3) დაჟანგული გლუტათიონი GSSG (0.012M)
- 4) NADPH (0.003M)

რეაქციის მსვლელობა:

1. 1მლ PBS + 0.5მლ EDTA + 0.5მლ GSSG + 0.2მლ NADPH + H₂O -თი ივსება 3მლ -მდე
2. + 0.1მლ ჰომოგენატი

რეაქტივი	Sample	Blank
PBS	1.0მლ	1.5მლ
EDTA	0.5მლ	0.5მლ
GSSG	0.5მლ	---
NADPH	0.2მლ	0.2მლ
Supernatant	0.1მლ	0.1მლ
H ₂ O	0.8მლ	0.8მლ

შედეგები:

იზომება სპექტროფოტომეტრიულად $\lambda=340$ ნმ, ყოველ 30 წამში, 2 წუთის განმავლობაში. ფერმენტის აქტივობა გამოითვლება ფორმულით

$$A(U/L) = (E_{\text{წით}} \times V_t) \times e \times d \times V_s$$

სადაც:

$$e = 6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{სმ}^{-1}$$

$$d = 1\text{სმ}$$

$$V_t = 3.1\text{მლ}$$

$$V_s = 0.1\text{მლ}$$

§12.5 აზოტის ჰაზმის (NO) რაოდენობის განსაზღვრა

§12.5.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) NaOH (0.3M)
- 2) ZnSO₄ (5%)
- 3) გრისის რეაქტივი (შეიცავს: 0.5N HCl -ზე დამზადებულ 0.25%VCl₃, 0.1% -იან სულფანილამიდს და 0.05% NEDD-ს)

რეაქციის მსვლელობა:

1. 100მკლ ჰომოგენატი + 100მკლ 0.3N NaOH
 2. ვურევთ 5 წუთის განმავლობაში
 3. + 100მკლ ZnSO₄
 4. ვურევთ 5 წუთის განმავლობაში
 5. ცენტრიფუგირება, 3000 RPM, 15წთ
 6. + 200მკლ გრისის რეაქტივი
 7. ინკუბაცია 30წთ, t=37°C
- * საკონტროლო სინჯარაში ჰომოგენატი ჩანაცვლებულია წყლით

შედეგები:

იზომება სპექტოფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{ნმ}$ და გამოითვლება NaNO₂ -ის სტანდარტულ მრუდზე.

§12.5.2 მეთოდი II

საჭირო რეაქტივები:

- 1) NaNO₂ (50 მკმოლ)
- 2) სულფანილამიდი (10 მმოლ)
- 3) NEDA (1 მმოლ)

რეაქციის მსვლელობა:

1. 10% -იანი ჰომოგენატი, რომელიც დამზადებულია ფოსფატის ბუფერზე, ცენტრიფუგირდება 4000RPM, 15წთ, t=4°C, სუპერნატანტის მისაღებად

რეაქტივი	Sample	Sample Blank	Standard	Standard Blank
სუპერნატანტი	0.1მლ	0.1მლ	---	---
NaNO ₂	---	---	0.1მლ	0.1მლ
სულფანილამიდი	1.0მლ	1.0მლ	1.0მლ	1.0მლ
ინკუბაცია 5წთ, t = RT°C				
NEDA	0.1მლ	---	0.1მლ	---
ინკუბაცია 5წთ, t = RT°C				

შედეგები:

იზომება სპექტოფოტომეტრიულად $\lambda = 540\text{ნმ}$ და გამოითვლება ფორმულით:
 $\text{მკმოლ/L} = (A_{\text{Sample}} / A_{\text{Standard}}) \times 50$

§12.6 მალონის დიალდეჰიდის (MDA) რაოდენობის განსაზღვრა

§12.6.1 მეთოდი I

საჭირო რეაქტივები:

- 1) H_3PO_4 (1%)
- 2) TBA (0.6%, H_2O - ზე)
- 3) n-ბუტანოლი

რეაქციის მსვლელობა:

1. 0.5მლ 10% - იანი ჰომეგენატი + 3მლ H_3PO_4 + 1მლ TBA
2. ინკუბაცია 100°C 45, წუთი
3. გაგრილების შემდეგ ვამატებთ 4 მლ n-ბუტანოლს
4. კარგად ვურევთ და ვაცენტრიფუგირებთ 3000RPM, 10წუთი

შედეგები:

ბუტანოლის ფრაქციას ვზომავთ $\lambda=535$ და $\lambda=520$. გაანგარიშება ხდება შემდეგი ფორმულით:

$$C = [(E - E') / 0.156] \times B \text{ მმოლ/მგ}$$

სადაც:

B - განზავების ხარისხია, ხოლო 0.156 – MDA-TBA კომპლექსის კოეფიციენტი

§12.5.2 მეთოდი II (მიკროპლანშეტისთვის)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) რეაქტივი A: ბუტილირებული ჰიდროქსიტოლუოლი, გახსნილი მეთა-ნოლში (10 %)
- 2) ტრიქლორძმარმჟავა (40%)
- 3) TBA (0.67%, გახსნილი 0.05 N NaOH)
- 4) ეთანოლი (96%)
- 5) TMP

რეაქციის მსვლელობა:

1. ჰომოგენატი (100 მგ/750 მკლ NaCl 0.9%) + 5 მკლ რეაქტივი A
2. ცენტრიფუგირება 3000 g , 15 წუთი , 4°C სუფერნატანტის მისაღებად
3. 350 მკლ სუპერნატანტი + 250 მკლ ტრიქლორძმარმჟავა
4. ცენტრიფუგირება 3000 g , 15 წუთი , 4°C სუფერნატანტის მისაღებად
5. 500 მკლ სუპერნატანტი + 500 მკლ TBA
6. ინკუბაცია 100°C , 15 წუთი
7. ფოსოებში გადაგვამ 200-200 მკლ

შედეგები:

გაზომვა ხდება მიკროპლანშეტურ სპექტროფოტომეტრზე, $\lambda=532$ ნმ. გამოთვ-ლა კი ხორციელდება სტანდარტული მრუდით , რომელიც აიგება წინასწარ :

- I. 0.5, 1, 1, 3, 3მმოლ TMP წინასწარ იხსნება 1 მლ ეთანოლსა და 49 მლ H₂O -ში.
- II. +500 მკლ TBA.
- III. ინკუბაცია და გაზომვა $\lambda = 532$ ნმ.

§12.7 უჯერი ცხიმოვანი მჟავების დიენური კონიუგატების განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.1 მოლ ფოსფატის ბუფერი (pH=7.6).
- 2) 9 მლ ხსნარი (ჰეპტანი:იზოპროპილენი - 1:1).
- 3) 0.5 მლ-ს ეთილის სპირტი.

რეაქციის მსვლელობა:

1. ცხიმოვანი მჟავების დიენური კონიუგატების განსაზღვრისათვის ვახდენდით მიღებული მიტოქონდრიების რესუსპენზირებას 0.1 მოლ ფოსფატის ბუფერში (pH=7.6), რის შემდეგაც 1 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ($\approx 10-15$ მგ ცილა) ემატებოდა 9 მლ სპეციალური ხსნარი (ჰეპტანი:იზოპროპილენი - 1:1) და ჰომოგენიზირდებოდა მინის ჰომოგენიზატორში 15 წუთის განმავლობაში.
2. მიღებული ჰომოგენატი გადაგვექონდა ცენტრიფუგის სინჯარებში, და ვაცენტრიფუგებდით 4000 g-ზე 10წთ- ის განმავლობაში.
3. ცენტრიფუგირებით მიღებული სუპერნატანტი გადაგვექონდა გრადუირებულ სინჯარებში და ვუმატებდით დისტილირებულ წყალს (1/10), ვანჯღრევდით და ვაცოვენებდით 5 წთ-ის განმავლობაში.
4. დაშრევების შემდეგ ფრთხილად ვაცილებდით ჰეპტანის ფაზას.
5. სინჯარაში დარჩენილი ხსნარის 0.5 მლ-ს ვუმატებდით ეთილის სპირტს (1:5/1:10) და ვსაზღვრავდით შუქშთანთქმას

შედეგები:

სპექტროფოტომეტრულად, $\lambda=235$ ნმ ტალღის სიგრძეზე

§12.8 ქსანთინ-ოქსიდაზას აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.05მოლ PBS, pH 7.5
- 2) სუბსტრატი: 10მგ ჰიპოქსანტინი / 500მლ წყალი

რეაქციის მსვლელობა:

1. საცდელ სინჯარაში ემატება 1.9მლ PBS, 0.1მლ ნიმუში და 1.0მლ სუბსტრატი
2. საკონტროლო სინჯარაში ნიმუშის ნაცვლად შეგვაქვს წყალი
3. ხსნარი იზომება სპექტროფოტომეტრულად, $\lambda = 290$ ნმ

შედეგები:

$$U/მგ = \Delta A/წთ \times 1000 / 1.22 \times 10^4 \times C$$

სადაც, $\Delta A/წთ$ აბსორბციის ცვლილებაა წუთში, ხოლო C - ცილის კონცენტრაცია.

თავი XIII

სატრანსპორტო ატმ-აზების შესწავლის მეთოდები

§13.1 Ca^{2+} ატმ-აზის აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.05მოლ Tris-HCl, pH 7.4
- 2) 7.5მოლ ATP (Tris-HCl-ზე)
- 3) 25მოლ CaCl_2 (Tris-HCl-ზე)
- 4) 2მოლ MgCl_2 (Tris-HCl-ზე)
- 5) 10% TCA
- 6) 1% ასკორბატი (0.1N HCl-ზე)
- 7) C რეაქტივი: H_2SO_4 : ამონიუმის მოლიბდატი:წყალი (1:1:4)

რეაქციის მსვლელობა:

1. ცინულოვან აბაზანაში ჩადგმულ სინჯარებში მზადდება ე.წ. აქტიური და პასიური ნარევეები:

აქტიური: 0.2მლ ნიმუში + 0.2მლ 7.5მოლ ATP + 0.2მლ 25მოლ CaCl_2 + 0.2მლ 2მოლ MgCl_2 + 0.2მლ Tris-HCl

პასიური: 0.2მლ ნიმუში + 0.2მლ 7.5მოლ ATP + 0.2მლ 2მოლ MgCl_2 + 0.2მლ Tris-HCl

2. ნარევი ინკუბირდება 30წთ 37°C -ზე
3. შემდეგ ემატება 0.1მლ 10% TCA და ცენტრიფუგირდება
4. სუპერნატანტში ისაზღვრება ფოსფორი ფისკე-სუბაროუს მოდიფიცირებული მეთოდით: 1მლ სუპერნატანტი + 1.5მლ რეაქტივი C + 0.1მლ ასკორბატი
5. ინკუბაცია 30წთ, 37°C -ზე
6. შუქშთანთქმა იზომება 660ნმ -ზე

შედეგები:

ფერმენტის აქტივობა = აქტიური ნარევის შუქშთანთქმა - პასიური ნარევის შუქშთანთქმა

§13.2 Na/K ატმ-აზის აქტივობის განსაზღვრა

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.05მოლ Tris-HCl, pH 7.4
- 2) 12.5მოლ ATP (Tris-HCl-ზე)
- 3) 12.5მოლ MgCl_2 (Tris-HCl-ზე)
- 4) Na/K: 120მოლ NaCl, 30მოლ KCl (Tris-HCl-ზე)
- 5) 1% ასკორბატი (0.1N HCl-ზე)
- 6) C რეაქტივი: H_2SO_4 : ამონიუმის მოლიბდატი:წყალი (1:1:4)
- 7) ლუაბაინი

რეაქციის მსვლელობა:

1. ყინულოვან აბაზანაში ჩადგმულ სინჯარებში მზადდება ე.წ. აქტიური და პასიური ნარევეები:

აქტიური: 0.2მლ ნიმუში + 0.2მლ Na/K + 0.2მლ $MgCl_2$ + 0.2მლ Tris-HCl

პასიური: 0.2მლ ნიმუში + 0.2მლ ოუაბაინი + 0.2მლ $MgCl_2$ + 0.2მლ Tris-HCl

2. ნარევი ინკუბირდება 15წთ $37^{\circ}C$ -ზე

3. კვლავ ვდგავთ ცივ აბაზანაში

4. შემდეგ ისაზღვრება ფოსფორი ფისკე-სუბაროუს მოდიფიცირებული მეთოდით: ნარევს ვამატებთ 1.5მლ C რეაქტივს

5. ინკუბაცია 15წთ, $37^{\circ}C$ -ზე

6. შემდეგ ვამატებთ 0.01მლ ასკორბატს

7. ინკუბაცია 25წთ

8. შუქშთანთქმა იზომება 660ნმ -ზე

შედეგები:

ფერმენტის აქტივობა = აქტიური ნარევის შუქშთანთქმა - პასიური ნარევის შუქშთანთქმა

ნაწილი III

კვლევის მეთოდები მოლეკულურ
ბიოლოგიაში

თავი XIV

პოლიმერაზულ-ჯაჭვური რეაქცია (PCR)

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ / PCR) შეიქმნა 1983 წელს დოქტორ კარი მალისის მიერ, რითიც მოახდინა რეგულაცია მოლეკულურ ბიოლოგიაში და რისთვისაც მან 1993 წელს მიიღო ნობელის პრემია ქიმიაში. ეს მეთოდი დნმ-ის გამოყოფისა და შესწავლის საშუალებას გვაძლევს. PCR ციკლური მეთოდია, თითოეული ციკლი კი 3 ძირითად ეტაპს მოიცავს, ესენია: (1) დნმ-ის ჯაჭვების დენატურაცია (96°C); (2) პრაიმერების ჰიბრიდიზაცია (55°C); და (3) დაგრძელება ანუ ელონგაცია (72°C). ამის შემდეგ საჭიროა დნმ-ის ელექტროფორეზი.

§14.1 დნმ-ის პჯრ

საჭირო რეაქტივები:

- 1) PCR ბუფერი $\times 10$
- 2) 10მმოლ dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP. 2.5მმოლ თითოეული)
- 3) 25მმოლ MgCl_2 (იმ შემთხვევაში თუ PCR ბუფერი არ შეიცავს)
- 4) 10-20მკმოლ პრაიმერები
- 5) 0.5-2.5 U/მკლ Taq-პოლიმერაზა

რეაქციის მსვლელობა:

1. ყინულის ფირფიტაზე ვათავსებთ პლანშეტს, რომლის ფოსოებშიც ვაწყობთ PCR-ის სინჯარებს (0.2მლ)
2. სინჯარებში შეგვავსებს რეაგენტები შემდეგი თანმიმდევრობითა და მოცულობით: წყალი (იმდენი, რომ საბოლოო ხნარის მოცულობა იყოს 20-დან 50მკლ-მდე), 5მკლ PCR ბუფერი $\times 10$, 1მკლ 10მმოლ dNTPs, 8მკლ MgCl_2 (თუ საჭიროა), 1-1მკლ 20მკმოლ პრაიმერები, ნიმუში (ისე რომ დნმ-ის საბოლოო რაოდენობა იყოს 0.1-1მკგ), 0.5-2.5 U/მკლ Taq-პოლიმერაზა
3. მოათავსეთ თერმოციკლერში, რომელიც დაყენებულია შესაბამის რეჟიმზე:

ნაბიჯი 1: $92 - 98^{\circ}\text{C}$, 0.5 - 1 წთ

ნაბიჯი 2: $37 - 67^{\circ}\text{C}$, 0.5 - 1 წთ

ნაბიჯი 3: 72°C , 0.5 - 1 წთ

გაიმეორეთ ნაბიჯები 1 - 3, 20-30წთ

ნაბიჯი 4: გააგრძელეთ და შეინახეთ 4°C -ზე გელ ელექტროფორეზამდე (გვ. 87)

4. აუცილებელია, ნიმუშების პარალელურად ჩატარდეს ბრმა ცდა ანუ ე.წ. ნეგატიური კონტროლი

§14.2 რნმ-ის პჯრ

რნმ-ის პოლიმერაზულ-ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) წარმართვისათვის აუცილებელია ე.წ. რევერსული ტრანსკრიპცია, ანუ რნმ-ის „ფორმატირება“ დნმ-ში და შემდეგ პჯრ-ის წარმართვა. ამისათვის:

საჭირო რეაქტივები:

- 1) PCR ბუფერი $\times 10$
- 2) 10მმოლ dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP. 2.5მმოლ თითოეული)
- 3) 25მმოლ MgCl_2 (იმ შემთხვევაში თუ PCR ბუფერი არ შეიცავს)

- 4) 10-20მკმოლ პრაიმერები
- 5) 0.5-2.5 U/მკლ Taq-პოლიმერაზა

რეაქციის მსვლელობა:

1. ქსოვილის ჰომოგენიზაცია ხდება საჰომოგენიზაციო ბუფერში, რის შემდეგაც ემატება 0.2მლ ქლოროფორმი / მლ ბუფერზე.
 2. ინკუბაცია 2-3წთ, ოთახის ტემპერატურაზე
 3. ცენტრიფუგირება 12000g, 15წუთი, 4°C
 4. სუპერნატანტი გადაგვაქვს ახალ სინჯარაში და ვამატებთ 0.5მლ იზოპროპილის სპირტს,
 5. ინკუბაცია 10წთ, ოთახის ტემპერატურაზე
 6. ცენტრიფუგირება 12000g, 10წუთი, 4°C
 7. ნალექს ვრეცხავთ 1მლ ეთანოლით და ვაცენტრიფუგირებთ 7500g, 5წუთი, 4°C
 8. ნალექი იხსნება 0.5% SDS-ში და ინკუბირდება 55-60°C, 10წთ
 9. 10მკლ რნმ (5მკგ) გადაგვაქვს 1.5მლ სინჯარაში და ვაინკუბირებთ 65°C, 10წთ
 10. სინჯარებში რომელშიც გვაქვს 10მკლ რნმ შეგვაქვს რეაგენტები შემდეგი თანმიმდევრობითა და მოცულობით: 17მკლ წყალი, 3მკლ PCR ბუფერი x10, 2.5მკლ 10მმოლ dTNPs, 6მკლ MgCl₂, 1მკლ პრაიმერები (1მკგ), 0.5მკლ რევერს-ტრანსკრიპტაზა
 11. ინკუბაცია 10წთ, 25°C. შემდეგ 1სთ, 42°C
 12. მიღებული კომპლემენტარული დნმ-ის დენატურაცია 95°C
 13. 0.5მლ-იან სინჯარაში შეგვაქვს: წყალი (იმდენი, რომ საბოლოო ხნარის მოცულობა იყოს 20-დან 50მკლ-მდე), 5მკლ PCR ბუფერი x10, 1მკლ 10მმოლ dTNPs, 8მკლ MgCl₂ (თუ საჭიროა), 1-1მკლ 20მკმოლ პრაიმერები, 6მკლ კომპლემენტარული დნმ, 0.5-2.5 U/მკლ Taq-პოლიმერაზა
 14. მოათავსეთ თერმოციკლერში, რომელიც დაყენებულია შესაბამის რეჟიმზე:
- ნაბიჯი 1: 92 - 98°C, 0.5 - 1 წთ
- ნაბიჯი 2: 37 - 67°C, 0.5 - 1 წთ
- ნაბიჯი 3: 72°C, 0.5 - 1 წთ
- გაიმეორეთ ნაბიჯები 1 - 3, 20-30წთ
- ნაბიჯი 4: გააგრძელეთ და შეინახეთ 4°C-ზე გელ ელექტროფორეზამდე (გვ. 87)
5. აუცილებელია, ნიმუშების პარალელურად ჩატარდეს ბრმა ცდა ანუ ე.წ. ნეგატიური კონტროლი

თავი XV

ნუკლეინის მჟავების კონკრეტული თანამიმდევრობების გამოვლენის მეთოდები

ნიმუშში დნმ-ის კონკრეტული თანამიმდევრობის გამოსავლენად გამოიყენება მეთოდი, რომელსაც Southern Blotting ეწოდება. ამავე მიზნისთვის, რნმ-ის შემთხვევაში გამოიყენება ე.წ. Northern Blotting-ი.

§15.1 Southern Blotting

საჭირო რეაქტივები:

- 1) TBE x10: 1.3M Tris, 450მმოლ ბორის მჟავა, 25მმოლ EDTA. pH 8.0
- 2) SSPE x20: 2.98მოლ NaCl, 0.02მოლ EDTA, 0.2მოლ PBS. pH 7.4
- 3) მადენატურირებელი ხსნარი (DS) x1: 1.5მოლ NaCl, 0.5N NaOH. pH 13.0
- 4) ნეიტრალიზაციის ბუფერი (NB): 1.5მოლ NaCl, 1მოლ Tris. pH 7.5
- 5) Denhardt-ის ხსნარი (DS) x50: 1% BSA, 1% ფიკოლი, 1% პოლივინილპიროლიდონი
- 6) პრეჰიბრიდიზაციის ბუფერი x2: 30მლ SSPE + 10მლ DS + 10მლ 10% SDS + 50მლ H₂O
- 7) ჰიბრიდიზაციის ბუფერი x1: 30მლ SSPE + 10მლ 10% SDS + 60მლ H₂O
- 8) Probe ბუფერი: 50მკლ 1მოლ Tris-HCl (pH 7.4) + 5მკლ 2მოლ MgCl₂ + 10მკლ 0.5მოლ DTT + 35მკლ H₂O
- 9) Probe ნარევი: 2.7მკლ Probe ბუფერი + 2მკლ ოლიგონუკლეოტიდის ზონდი (Probe) (2მკგ/მკლ) + 1მკლ T4 ფოსფონუკლეოტიდ კინაზა (PNK) + 11.3მკლ H₂O + 10მკლ ³²P-ATP
- 10) სარეცხი ბუფერი 1 (x6): 180მლ SSPE + 12მლ 10% SDS + 408მლ H₂O
- 11) სარეცხი ბუფერი 2 (x1): 30მლ SSPE + 12მლ 10% SDS + 558მლ H₂O

რეაქციის მსვლელობა:

1. დნმ უნდა გაიხლიჩოს შესაბამისი რესტრიქტაზას საშუალებით, 2-24სთ, 37°C
2. საჭიროებისამებრ შესაძლებელია დნმ-ის კონცენტრირება ეთანოლით გამოლექვის გზით, თუმცა გელზე დატანამდე სპირტი სრულად უნდა იყოს მოშორებული.
3. დაყავით დნმ აგაროზას გელზე.
4. გელი უნდა შეიღებოს ბრომირებული ეტიდიუმით ულტრაიისფერ ტრანსლუმინატორზე გამოსახულების მისაღებად.
5. ტრანსფერის დროს ელექტროფორეზის გელზე არსებული დნმ გადადის მემბრანაზე.
6. გელი გადაიტანეთ ჭურჭელში, რომელიც შეიცავს იმდენ მადენატურირებელ ხსნარს, რომ გელი მთლიანად დაფაროს. გარეცხეთ გელი ორჯერ ამ ხსნარით, თითოეული გარეცხვა გრძელდება 25 წუთის განმავლობაში შეიკერზე.
7. გელი ორჯერ გადარეცხეთ წყლით.
8. გადარეცხეთ გელი ორჯერ ნეიტრალიზაციის ბუფერით, თითოეული გადარეცხვა გრძელდება 15 წუთი, შეიკერზე.
9. გელი ორჯერ გადარეცხეთ წყლით.
10. გადარეცხეთ გელი 20X SSPE-ით შეიკერზე 30 წუთის განმავლობაში.
11. ზემოაღნიშნული ნაბიჯის დროს მოამზადეთ Whatman-ის ქაღალდი და მემბრანა ტრანსფერის პროცედურისთვის.

12. დავჭრათ მემბრანა საჭირო ზომაზე და დავასველოთ წყალში. დავჭრათ Whatman-ის ქაღალდი, ისე რომ იგი გელზე უფრო ფართო იყოს და დაასველოთ იგი 10X SSPE ბუფერში (ტრანსფერის ბუფერი).
13. დავჭრათ სამი ცალი ფილტრის ქაღალდი, თითქმის გელის ზომაზე.
14. დავჭრათ რამდენიმე ფილტრის ქაღალდი, თითქმის გელის ზომაზე.
15. მოათავსეთ სტაბილური პლატფორმა ჭურჭელზე, რომელზეც უკვე დასხმულია 10X SSPE.
16. მოათავსეთ პლასტიკის სახვევი პლატფორმაზე. მოათავსეთ ფილტრის ქაღალდი, რომელიც დასველებულია 10X SSPE-ით პლასტიკზე. დარწმუნდით, რომ ჰაერის ბუშტები არ არის დარჩენილი და ასეთის არსებობის შემთხვევაში გამოდევნეთ მინის წკირის გამოყენებით. დარწმუნდით, რომ Whatman-ის ქაღალდის კიდეები ეხება SSPE ბუფერს.
17. დადეთ გელი, ზედაპირით ქვემოთ სველ ვატმანის ქაღალდზე. მემბრანა დადეთ გელის თავზე. დარწმუნდით, რომ ჰაერის ბუშტები არ არის დარჩენილი და ასეთის არსებობის შემთხვევაში გამოდევნეთ მინის წკირის გამოყენებით.
18. მემბრანაზე მოათავსეთ ვატმანის ქაღალდის სამი ფენა. ბუშტუკები გამოდევნეთ მინის წკირის გამოყენებით.
19. მოათავსეთ მასზე ფილტრის ქაღალდის დასტა და დაადეთ თავზე სიმძიმე (მაგ. მინის ფირფიტები)
20. ეს აწყობილი კონსტრუქცია გააჩერეთ ერთი ღამით დნმ-ის ფრაგმენტების სრული გადატანისთვის.
21. გადატანის დასრულების შემდეგ, მოათავსეთ ბლოტი ულტრაიისფერ კროსლინკერში.
22. პრეჰიბრიდიზაციის ეტაპი (ასევე ცნობილია როგორც ბლოკირება) კეთდება იმისათვის, რომ მინიმუმამდე შემცირდეს ზონდის არასპეციფიკური დაკავშირება მემბრანაზე. ორაგულის სპერმის დნმ ჩვეულებრივ გამოიყენება როგორც მახლოკირებელი აგენტი.
23. გაათბეთ პრეჰიბრიდიზაციის ხსნარი 42 °C-მდე.
24. გააცხელეთ ორაგულის სპერმის დნმ-ის ნიმუში 95°C-მდე 5 წუთის განმავლობაში და დაუყოვნებლივ დადაიტანეთ ყინულზე.
25. დაამატეთ ორაგულის სპერმის დნმ თბილ პრეჰიბრიდიზაციის ხსნარს ისე, რომ დნმ-ის საბოლოო კონცენტრაცია იყოს 50 მკგ/მლ.
26. ამოიღეთ მემბრანა UV კროსლინკერიდან და ფრთხილად გადაახვიეთ ჰიბრიდიზაციის მილში.
27. დაამატეთ პრეჰიბრიდიზაციის ხსნარი სპერმის დნმ-ით ჰიბრიდიზაციის მილში და მოათავსეთ იგი 42°C ტემპერატურაზე ჰიბრიდიზაციის ლუმელში 5 საათის განმავლობაში.
28. მოამზადეთ 1X Probe ნარევი და ჩადეთ წყლის აბაზანაში 37°C ტემპერატურაზე 40 წუთის განმავლობაში.
29. თავისუფალი ნაწილის (მოუნიშნავი) მოშორება შესაძლებელია, ზონდის ნარევის G-25 Sephadex სვეტის გავლით.
30. განსაზღვრეთ ზონდის სპეციფიკური აქტივობა თხევადი სცინტილაციის გამოყენებით.
31. გაათბეთ 10 მლ ჰიბრიდიზაციის ხსნარი 49°C-მდე, დაამატეთ მას 10-15 X 106 cpm-ოლ ზონდი და კარგად აურიეთ.
32. გადაავდეთ წინასწარი ჰიბრიდიზაციის ხსნარი ბლოტიდან; დაამატეთ ჰიბრიდიზაციის ხსნარი მონიშნული ზონდით. ინკუბაცია ღამით 49°C-ზე.
33. გაათბეთ სარეცხი ბუფერი 1 49°C-მდე. გადაასხით ჰიბრიდიზაციის ხსნარი ბლოტიდან და დაამატეთ სარეცხი ბუფერი 1
34. მოამზადეთ 1X სარეცხი ბუფერი 2 და გაათბეთ 49°C -მდე. გადარეცხეთ დაახლოებით 30 წამის განმავლობაში და გადაასხით.
35. შეამოწმეთ ბლოტი აქტივობისთვის გეიგერის მრიცხველით. სასურველია 10-50 დათვლა წამში დასხივების მწვერვალების ზოლებით. თუ ფონი ძალიან მაღალია, კვლავ გადარეცხეთ 1X სარეცხი ბუფერი 2 -ით.
36. ბლოტი მოათავსეთ კასეტაში, რომელშიც წინასწარ მოთავსებულია პლასტიკის სახვევი და გაახვიეთ მასში მემბრანა ისე, რომ არ დარჩეს ბუშტუკები.

37. გადაიტანეთ კასეტა ბნელ ოთახში და მოათავსეთ რენტგენის ფირი ბლოტზე. ჩაკეტეთ კასეტა და განათავსეთ იგი -80 °C-ზე მთელი ღამის განმავლობაში.
38. გაამჟღავნეთ ფირი მეორე დღეს. (იხ გვერდები 72-73)

§15.2 Northern Blotting

მთელი პროცესი ანალოგიურია Southern Blotting-ის, იმ განსხვავებით, რომ ელექტროფორეზისთვის შეგვარეს არა დნმ-ის არამედ რნმ-ის ნიმუშები.

§15.3 ქრომატინის იმუნოპრეციპიტაცია (CHIP)

ChIP ანუ ქრომატინის იმუნოპრეციპიტაცია, ცილა-დნმ კომპლექსების გამოყოფის მეთოდია, რაც მოგვიანებით საშუალებას იძლევა ჩატარდეს PCR, qPCR, ან დნმ-ის სეკვენირება.

საჭირო რეაქტივები:

- 1) PBS x10: 0.2 KH₂PO₄, 1.5მოლ NaCl
- 2) PMSF
- 3) 0.4% Trypan-Blue
- 4) გაჯირვების ბუფერი: 25მმოლ HEPES (pH 7.8), 1.5მმოლ MgCl₂, 10მმოლ KCl, 0.1% NP-40, 1მმოლ DTT, 0.5მმოლ PMSF, პროტეაზების ინჰიბიტორების მიქსი.
- 5) სონიკაციის ბუფერი: 50მმოლ HEPES (pH 7.9), 140მმოლ NaCl, 1მმოლ EDTA, 1% ტრიტონ X-100, 0.1% Na-დეოქსიკოლატი, 0.1% SDS, 0.5მმოლ PMSF, პროტეაზების ინჰიბიტორების მიქსი.
- 6) დნმ
- 7) ხარის შრატის ალბუმინი (BSA)
- 8) Protein A ან Protein G Sepharose
- 9) სარეცხი ბუფერი A: 50მმოლ HEPES (pH 7.9), 500მმოლ NaCl, 1მმოლ EDTA, 1% ტრიტონ X-100, 0.1% Na-Deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5მმოლ PMSF, პროტეაზების ინჰიბიტორების მიქსი.
- 10) სარეცხი ბუფერი B: 20მმოლ Tris-HCl (pH 8.0), 250მმოლ LiCl, 1მმოლ EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate, 0.5მმოლ PMSF, პროტეაზების ინჰიბიტორების მიქსი.
- 11) TE ბუფერი
- 12) ელუციის ბუფერი: 50მმოლ Tris-HCl (pH 8.0), 1მმოლ EDTA, 1% SDS, 50მმოლ NaHCO₃
- 13) 4მოლ NaCl
- 14) რნმაზა A
- 15) EDTA
- 16) პროტეინკინაზა A
- 17) ფენოლი : ქლოროფორმი : იზოამილის სპირტი
- 18) გლიკოგენი 20მგ/მლ
- 19) 3მოლ Na-აცეტატი
- 20) ეთანოლი
- 21) 1.0მოლ Tris-HCl (pH 7.6)

რეაქციის მსვლელობა:

1. დააჰომოგენიზირეთ ნიმუში ცივ PBS-ში, რომელსაც დამატებული აქვს PMSF
2. დააცენტრიფუგირეთ 1000rpm, 5წთ, ნალექის მისაღებად

3. მოახდინეთ რესუსპენზირება ათმაგ მოცულობა გაჯირჯვების ბუფერში და დატოვეთ 10წთ.
4. დააცენტრიფუგირეთ 2000rpm, 5წთ ნალექის მისაღებად
5. ნალექს დაამატეთ 5-10მლ სონიკაციის ბუფერი და დატოვეთ სონიკაციაზე (x9), 10-20წმ, 80% რეჟიმზე.
6. დააცენტრიფუგირეთ 14 000rpm, 15წთ სუპერნატანტის მისაღებად
7. ამის შემდეგ სუპერნატანტი კვლავ დააცენტრიფუგირეთ 14 000rpm, 15წთ
8. სუპერნატანტს დაამატეთ 1მკგ/მლ საბოლოო კონცენტრაციამდე DNA და 1მგ/მლ -მდე BSA
9. მოამზადეთ A ან G Sepharose სვეტი: მინიმუმ სამჯერ გადარეცხეთ Sonication Buffer-ით, შემდეგ კი დატოვეთ მინიმუმ 4 სთ სონიკაციის ბუფერში, რომელსაც დამატებული აქვს დნმ და BSA, საბოლოო კონცენტრაციებით 1მკგ/მლ და 1მგ/მლ.
10. მიღებულ ლიზატს დაამატეთ უკვე დამუშავებული სვეტი 40-50მკგ/მლ და დატოვეთ 2სთ, მაცივარში
11. დააცენტრიფუგირეთ 2000rpm, 5წთ, ნალექის მისაღებად
12. ნალექი გახსენით ლიზისის ბუფერში, რომელიც შეიცავს 1% SDS-ს
13. განაზავეთ 50მკლ 1მლ-მდე
14. დაამატეთ 5მკლ ანტისხეული და დააინკუბირეთ 2 სთ.
15. დაამატეთ 40მკლ Sepharose და დატოვეთ მთელი ღამით
16. დააცენტრიფუგირეთ 6000rpm, 3წთ
17. გადარეცხეთ ორჯერ 1 მლ სონიკაციის ბუფერით
18. გადარეცხეთ ორჯერ 1 მლ სარეცხი ბუფერი A -ით
19. გადარეცხეთ ორჯერ 1 მლ სარეცხი ბუფერი B -ით
20. გადარეცხეთ ორჯერ 1 მლ TE ბუფერი -ით
21. დაამატეთ 200მკლ ელუციის ბუფერი და დატოვეთ 10წთ, 65°C -ზე
22. დააცენტრიფუგირეთ 14 000rpm, 1წთ სუპერნატანტის მისაღებად
23. დაამატეთ 21მკლ NaCl
24. ინკუბაცია 65°C -ზე, 5სთ (შესაძლოა მთელი ღამეც)
25. დაამატეთ 1მკლ რნმაზა A და დატოვეთ 37°C -ზე, 1სთ
26. დაამატეთ 4მკლ EDTA და 2მკლ პროტეინკინაზა A
27. ინკუბაცია 42°C -ზე, 2სთ
28. მოახდინეთ ექსტრაგირება 2ჯერადად ფენოლ-ქლოროფორმ-იზოამილის სპირტის ხსნარით
29. დაამატეთ 1მკლ გლიკოგენი, 40მკლ Na-აცეტატი და 1მლ ეთანოლი
30. დაავორტექსეთ და დატოვეთ -20°C -ზე, მთელი ღამე
31. დააცენტრიფუგირეთ 14000rpm, 30წთ
32. გადარეცხეთ 80% ეთანოლით
33. მოახდინეთ რესუსპენზირება 100მკლ 10მმოლ Tris-HCl-ში (pH 7.6) და ხსნარი მზადაა შემდგომი კვლევებისთვის (მაგ. პჯრ)

ნაწილი IV

ჰისტორიული კვლევის მეთოდები

თავი XVI

ცილების ზელების მეთოდები

უკვე საკმაოდ ხანია, რაც ციტო- და ჰისტოქიმიური მეთოდები მნიშვნელოვან ადგილს იკავებენ ბიომედიცინაში. მოლეკულურ ფსიქიატრიაში ჰისტოქიმიური მეთოდები გამოიყენება ამა თუ იმ საღებავის დახმარებით თავის ტვინის ანათლებში საკვლევი მოლეკულების მოსანიშნად, მიკროსკოპირებით შემდგომი შესწავლისა და ანალიზისათვის.

§16.1 ცილების სულემ-ბრომფენოლ ლურჯით გამოვლენის მეთოდი

(პარნას ფიქსატორი, ფორმალინი და სხვა; მოვარიდოთ ოსმიუმს)

საჭირო რეაქტივები:

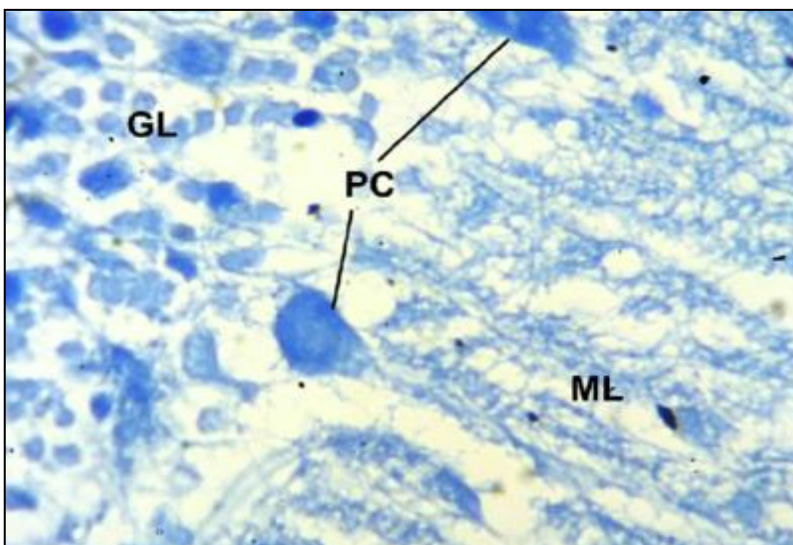
- 1) HgCl_2 (1%)
- 2) ბრომფენოლის ლურჯი (0.05 %)
- 3) ძმარმუჟა (2%)
- 4) მესამეული ბუტილის სპირტი

რეაქციის მსვლელობა:

1. სამუშაო ხსნარის დამზადება: 0.05% ბრომფენოლის ლურჯის ხსნარი, დამზადებული 2% -იან ძმარმუჟაზე, გავაჯეროთ 1% -იანი HgCl_2 -ით
2. მივიყვანოთ დეპარაფინიზებული ანათლები წყლამდე
3. ანათლები შევვლოთ სამუშაო ხსნარში 2 საათის განმავლობაში, $t=RT^{\circ}\text{C}$
4. ანათლების დიფერენცირება ხდება 0.5 % -იანი ძმარმუჟით, 1-5 წუთის განმავლობაში
5. ანათლები პირდაპირ გადავიტანოთ მესამეული ბუტილის სპირტში
6. გავაუწყლონოთ, გავაღიავოთ ქსილოლით და დავფაროთ საფარი მინით

შედეგები:

ცილები იღებენ ლურჯ შეფერილობას (იხილეთ სურათი 12).



სურათი 12. სულემ-ბრომფენოლის მეთოდით შეღებილი ნათხემის ანათლები

§16.2 ცილებთან დაკავშირებული NH₂- ჯგუფების გამოვლენა ოქსი-ნაფტალდეჰიდის მეთოდით

(ციტოქლაზმური NH₂- ჯგუფებისთვის მეტად მიზანშეწონილია ეთანოლით, აცეტონით, კარნოას ფიქსატორით დაფიქსირებული ქსოვილის პარაფინირებული ანათლები, ხოლო ბირთვული NH₂ - ჯგუფებისთვის საუკეთესოა ცენკერის ფიქსატორი)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 3-ოქსი-2-ნაფტალდეჰიდი
- 2) აცეტონი
- 3) 0.1 მოლ ვერონალ-აცეტატის ბუფერი (pH=8.5)
- 4) 0.1 მოლ ვერონალ-აცეტატის ბუფერი (pH=7.4)

რეაქციის მსვლელობა:

1. მივიყვანოთ დეპარაფინირებული ანათლები წყლამდე
2. დავამზადოთ სამუშაო ხსნარი, რომელიც შეიცავს: 20მგ 3-ოქსი-2-ნაფტალდეჰიდი, გახსნილი 20მლ აცეტონში, რომელსაც დამატებული აქვს 30მლ 0.1მოლ ვერონალ-აცეტატის ბუფერი (pH = 8.5)
3. ანათლების ინკუბაცია ახლად დამზადებული სამუშაო ხსნარში, 1 საათის განმავლობაში, t=RT°C
4. რეცხვა 3 პორცია დისტილირებულ წყალში (5 წთ / პორცია)
5. გამჟღავნება 0.1მოლ ვერონალ-აცეტატის ბუფერში (pH=7.4)
6. ხსნარის ზედაპირზე დავყაროთ 25 მგ საღებავი Fast Blue B (სწრაფი ლურჯი B) . აღნიშნული რეაქტივი ნელ-ნელა შეაღწევს ქსოვილში და 3-5 წუთში მიაღწევს თავის მაქსიმუმს
7. 5 წუთის განმავლობაში გამდინარე წყალში რეცხვა
8. გავაუწყლოვნოთ, გავაღიავოთ ქსილოლით და დავფაროთ საფარი მინით

შედეგები:

მეტად რეაქციაუნარიანი NH₂ - ჯგუფები იღებს ლურჯ შეფერილობას, ხოლო ის უბნები რომლებიც შეიცავენ ნაკლებ NH₂ - ჯგუფებს მოვარდისფრო-მოწითალოს.

§16.3 მილონის რეაქცია - ბეკერის მოდიფიკაციით

(ფორმალინი;პარაფინირებული ანათლები)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) H₂SO₄
- 2) HgSO₄
- 3) NaNO₂ (0.25% - იანი)

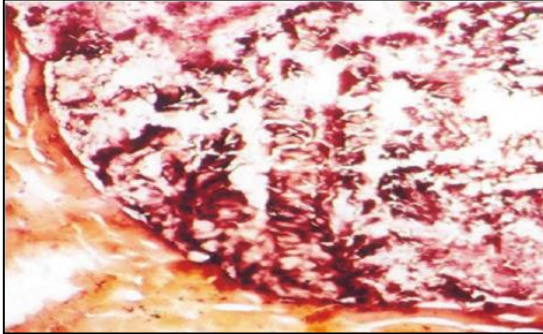
რეაქციის მსვლელობა:

1. დავამზადოთ სამუშაო ხსნარი: 100 მლ 10% H₂SO₄ დავამატოთ 10 მგ HgSO₄ და გავაცხელოთ სრულ გახსნამდე
2. მივიყვანოთ დეპარაფინირებული ანათლები წყლამდე
3. მოვათავსოთ ანათლები სამუშაო ხსნარში და გავაცხელოთ ადუღებამდე
4. გავაგრილოთ ოთახის ტემპერატურამდე

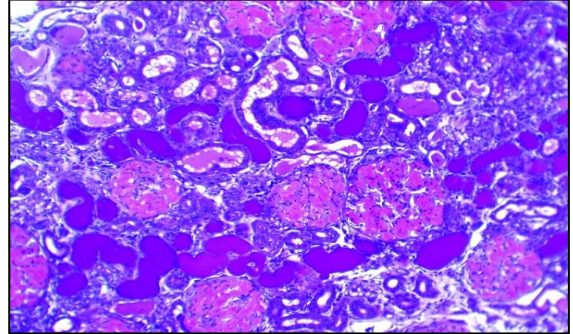
5. ამოვიღოთ ანათლები ხსნარიდან და გავრეცხოთ 3 პორცია დისტილირებულ წყალში (2 წთ/პორცია)
6. გავაუწყლოვნოთ, გავაღიავოთ ქსილოლით და დავფაროთ საფარი მინით

შედეგები:

ცილები, რომლებიც შეიცავენ თიროზინს იღებენ მოვარდისფრო, მონარინჯისფრო ან წითელ შეფერილობას. იხ. სურათი 13.



სურათი 13. მილონის რეაქცია ბეკერის მოდიფიკაციით



სურათი 14. მეთილის იისფრით შეღებილი ამილოიდი

§16.4 ამილოიდის გამოვლენის მეტაქრომატული მეთოდები

§16.4.1 მეთოდი I

(ფორმალინი ან სპირტი, პარაფინირებული ანათლები; ახლად გაყინული ანათლები დაფიქსირებული სპირტში)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) მეთილის იისფერი (methyl violet)
- 2) ფორმალინი
- 3) NaCl

რეაქციის მსვლელობა:

1. მივიყვანოთ დეფარაფინიზირებული ანათლები წყლამდე
2. შევღებოთ მეთილის იისფრის (methyl violet) 1% -იანი წყალხსნარით, 3 წუთის განმავლობაში.
3. დიფერენციაცია ფორმალინის 70% -იან წყალხსნარში
4. კარგად ჩამოვრეცხოთ და მოვათავსოთ NaCl -ის გაჯერებულ წყალ-ხსნარში, 5 წთ
9. კარგად ჩამოვრეცხოთ, გავაუწყლოვნოთ, გავაღიავოთ ქსილოლით და დავფაროთ საფარი მინით

შედეგები:

ამილოიდი იღებება მოვარდისფრო - მოწითალო ფრად, ხოლო დანარჩენი სტრუქტურების ფერი მერყეობს ლურჯიდან იისფრამდე. იხ. სურათი 14.

§16.4.2 მეთოდი II

(ყველა ტიპის მასალა; რეკომენდებულია ახლად გაყინული ანატომები, სწრაფად დაფიქსირებული ძმარმშავა - ეთანოლის ხსნარში)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) კონგო წითელი (Congo red)
- 2) KI
- 3) მაიერის ჰემალუმი
- 4) ფორმალინი

რეაქციის მსვლელობა:

1. შევლებოთ კონგო წითელის (Congo red) 1 % -იან წყალხსნარში, 1-6 საათი
2. დავამუშაოთ KI -ის 1% -იანი ხსნარით 60 წამი
3. დიფერენცირება 70 % იან სპირტში, იქამდე, სანამ არ დარჩება მხოლოდ შეღებილი ამილოიდი (საჭიროების შემთხვევაში გამოიყენება საკონტროლო ანატომები)
4. ჩამოვრეცხოთ წყლით
5. დამატებით შევლებოთ ბირთვები, მაიერის ჰემალუმით (Mayer's Hemalum) 1.5 - 3 წუთი
6. დიფერენცია 1% -იან შემუვებულ სპირტში, რამდენიმე წამი
7. მოვათავსოთ განზავებულ ბუფერში (pH=7-8) ანატომის გალურჯებამდე
8. გავაუწყლოვნოთ, გავაღიავოთ ქსილოლით და დავფაროთ საფარი მინით

შედეგები:

ამილოიდი იღებს აგურისფერ - წითელ შეფერილობას, ბირთვები - იღებენ ლურჯად.

თავი XVII

ნახშირწყალბადის ზედაპირის მეთოდები

§17.1 თქვენი მეთოდი გლუკოზის გამოსავლენად

საჭირო რეაქტივები:

- 1) Ba(OH)_2
- 2) AgNO_3
- 3) ნატრიუმის თიოსულფატი (5 %)

რეაქციის მსვლელობა:

1. დავაფიქსირებ ქსოვილის თხელი ფრაგმენტები (2მმ სისქის) მეთანოლში, რომელიც გაჯერებულია Ba(OH)_2 -ით, $t = -10^\circ\text{C}$, 24 სთ
2. გაუწყლოვნება, 3 პორცია აბსოლუტურ სპირტში
3. ჩავაყალიბებ პარაფინში
4. დავამზადებ 5-10 მკ სისქის ანათლები და დავიტანოთ სასაგნე მინებზე, რომლებიც დაფარულია ცილით.
5. მოვათავსებ თერმოსტატში, $t = 56-58^\circ\text{C}$, მანამ, სანამ პარაფინი არ გალღვება
6. მოვაცილოთ პარაფინი ქლოროფორმით და გადავიტანოთ ანათლები აბსოლუტურ სპირტში
7. ანათლები მოვათავსებ AgNO_3 -ის სპირტხსნარში (90 მლ ეთანოლი + 10მლ AgNO_3 -ის წყალხსნარი)
8. გავრეცხებ 96% -იანი სპირტის რამდენიმე პორციაში
9. მოვათავსებ ფორმალინის სპირტხსნარში (90 მლ ეთანოლი + 10 მლ 40 % - იანი ფორმალდეჰიდი)
10. დაღმავალი სპირტებით დავიცვანოთ წყლამდე
11. დავაფიქსირებ ნატრიუმის თიოსულფატის ხსნარში 30 წამის განმავლობაში
12. ჩამოვრეცხებ გამოხდილი წყლით, გავაუწყლოვნებ, გავაღიავებ და დავაფიქსირებ სასაგნე მინაზე შესაბამისი ფისით (რომელსაც არ უნდა ჰქონდეს რედუქტაზული თვისებები)

შედეგები:

ვერცხლის შავი ნალექი მიუთითებს უბნებზე, რომლებიც შეიცავენ გლუკოზას.

§17.2 ნახშირწყალზემცველი ლიკიდების გამოვლენის მეთოდები (ცერებროზიდებისა და განგლიოზიდების გამოსავლენად)

(ფორმალინი, პარაფინიზირებული ან გაყინული ანათლები)

§17.2.1 მეთოდი I (მოლიშის მოდიფიცირებული რეაქცია)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) α ნაფტოლის 5% - იანი სპირტხსნარი
- 2) H_2SO_4

რეაქციის მსვლელობა:

1. სამუშაო ხსნარის დამზადება - 0.5მლ α ნაფტოლის 5% -იანი სპირტხსნარი + 10მლ 2N H_2SO_4
** პარაფინიზირებული ანათლების გამოყენების შემთხვევაში საჭიროა დეპარაფინიზაცია*
2. მინაზე მოთავსებულ მშრალ ანათლებს დავამატოთ 2-3 წვეთი სამუშაო ხსნარი
3. ანათალი მოვათავსოთ (საფარი მინის გარეშე) თერმოსტატში, $t = 90 - 100^{\circ}C$.

შედეგები:

ცერებროზიდები და განგლიოზიდები იღებება მოიისფრო-მოწითალო ფრად. შეღებვა არამდგრადია და დაახლოებით 1 საათის შემდგომ ხდება რუხი.

§17.2.1 მეთოდი II (ბრუკნერის მოდიფიცირებული რეაქცია)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 3,5-დიოქსიტოლუოლის 2% -იანი წყალხსნარი
- 2) H_2SO_4

რეაქციის მსვლელობა:

1. სამუშაო ხსნარის დამზადება - 1მლ 3,5-დიოქსიტოლუოლის 2% -იანი წყალხსნარი + 10მლ 2N H_2SO_4
** პარაფინიზირებული ანათლების გამოყენების შემთხვევაში საჭიროა დეპარაფინიზაცია*
2. მინაზე მოთავსებულ ანათლებს დავამატოთ 2-3 წვეთი სამუშაო ხსნარი
3. ანათალი მოვათავსოთ (საფარი მინის გარეშე) თერმოსტატში , $t = 90 - 100^{\circ}C$.

შედეგები:

ცერებროზიდები და განგლიოზიდები იღებებიან განსხვავებული ელფერიტ, რომელიც მერყეობს წითელიდან - ლურჯამდე.

§17.3 ბალეს მეთოდის მოდიფიკაცია ნარკოტიკული ქსოვილისათვის

საჭირო რეაქტივები:

- 1) $FeCl_3$
- 2) სუდან IV (Sudan IV)
- 3) NH_3
- 4) გლიცერინი
- 5) HCl
- 6) $(NH_4)_2SO_4 \cdot Al_2(SO_4)_3$
- 7) კალიუმის ფეროციანიდი

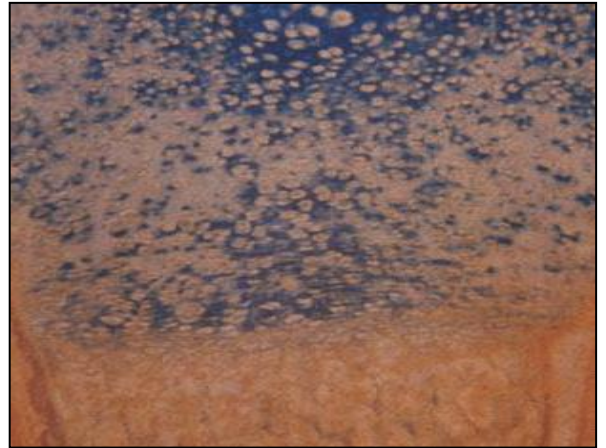
რეაქციის მსვლელობა:

1. დავამზადოთ რკინის კოლოიდური ხსნარი: გავხსნათ 75გ $FeCl_3$, 250 მლ დისტილირებულ წყალში, დავამატოთ 100მლ გლიცერინი და შემდეგ თანდათანობით - 55მლ 28% -იანი NH_3 . საჭიროა ხსნარის ღიალიზი 3 დღის განმავლობაში
2. სასაგნე მინაზე დავიტანოთ ფორმალინში ფიქსირებული, გაყინული ან პარაფინიზებული ანათლები
3. ანათლები გადავიტანოთ 50% -იან სპირტში
4. შევღებოთ სუდან IV (Sudan IV) ხსნარით (ჰერკსჰეიმერის ხსნარში), 10 წუთის განმავლობაში

5. ჩამოვრეცხოთ 70% -იანი სპირტით და გავრეცხოთ ორ პორცია დისტილირებულ წყალში .
6. ანათლები გადავიტანოთ რკინის კოლოიდურ ხსნარში, 2 წუთით
7. ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით
8. დავამუშაოთ შემჟავებული კალიუმის ფეროციანიდით, 10 წუთის განმავლობაში (2 წილი 1% -იანი HCl + 1 წილი 2% -იანი კალიუმის ფეროციანიდი)
9. ორჯერადად ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით
10. დავაფიქსიროთ ხსნარში, რომელიც შეიცავს $26\text{გ } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24 \text{H}_2\text{O} + 5\text{მლ } 28\% \text{NH}_3 + 450\text{მლ}$ დისტილირებული წყალი
11. ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით
12. დავაფიქსიროთ სასაგნე მინაზე გლიცერინ - ჟელატინში

შედეგები:

მჟავა პოლისაქარიდები იღებენ მუქ-ლურჯ შეფერილობას, ხოლო ნეიტრალური ცხიმები - წითელ შეფერილობას. იხილეთ სურათი 15.



სურათი 15. გალეს მეთოდით შეღებილი პოლისაქარიდები და ნეიტრალური ცხიმები

თავი XVIII

ლიპიდების შეღებვის მეთოდები

§18.1 ოკამოტოს მეთოდი ქოლესტერინისა და მისი ეთერების გამოსავლენად

(ფორმალინი; გაყინული ანათლები)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) H_2SO_4
- 2) იოდი

რეაქციის მსვლელობა:

1. ანათლები დავიტანოთ სასაგნე მინაზე და შევამშრალეთ
2. დავამატოთ 2 წვეთი ახლად დამზადებული ხსნარი, რომელიც შეიცავს 10მლ კონცენტრირებულ H_2SO_4 -სა და 20მლ იოდის სპირტხსნარს
3. დავაფიქსიროთ სასაგნე მინაზე საფარი მინით

შედეგები:

ქოლესტერინი და მისი ეთერები იღებს მომწვანო-ლურჯ შეფერილობას, რომელიც ნარჩუნდება დაახლოებით 2-3 საათი.

§18.2 ლიპიდთა გეჟანგური ჟანგვის პროდუქტების გამოვლენის მეთოდი

(ახლად გაყინული ქსოვილის ანათლები, დამზადებული კრიოსტატი და დატანილი სასაგნე მინაზე)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 2,7-დიამინოფლუორენი
- 2) ჰემინი
- 3) ძმარმჟავა

რეაქციის მსვლელობა:

1. სამუშაო ხსნარის დამზადება - 100მგ 2,7-დიამინოფლუორენი + 5მგ ჰემინი + 5მლ ძმარმჟავა
2. სასაგნე მინაზე დატანილ 15მკ სისქის ანათალს დავამატოთ 2-3 წვეთი სამუშაო რეაქტივი და დავფაროთ საფარი მინით

შედეგები:

დადებით რეაქციად ითვლება მოიისფრო, მოლურჯო ან მომწვანო შეფერილობა.

§18.3 ოკამოტოს მეთოდი სფინგომიელინის გამოსავლენად (ფორმალინი; გაყინული ანათლები)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$
- 2) აცეტონი
- 3) NaCl
- 4) KI
- 5) დიფენილკარბაზონი

რეაქციის მსვლელობა:

1. ჩამოვრეცხოთ ანათლები აცეტონით
2. მოვათავსოთ ეთერში 48 სთ, $t = RT^\circ\text{C}$
3. გავრეცხოთ აცეტონში
4. გავრეცხოთ წყალში
5. მოვათავსოთ 24 საათი $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ -ის ნაჯერ სპირტხსნარში (10 მლ 60% -იანი ეთანოლი + 0.2მლ NaCl -ის 0.2% -იანი წყალხსნარი), $t = 2-4^\circ\text{C}$
6. რეცხვა დისტილირებულ წყალში
7. დავამუშაოთ KI -ის 5% -იანი ხსნარით 4-5 წუთის განმავლობაში (ამ დროს ანათლები მოწითალო - მოყვითალო შეფერილობას იღებენ, ხოლო 2-3 წუთში ეს შეფერილობა ქრება)
8. გავრეცხოთ წყალში 10 წუთის განმავლობაში
9. დავამუშაოთ ნატრიუმის აცეტატის 2% -იანი ხსნარით, 10 წუთის განმავლობაში
10. მოვათავსოთ დიფენილკარბაზონის ნაჯერ ხსნარში (90% სპირტზე დამზადებული), 10 წუთი
11. გავრეცხოთ წყალში და დავაფიქსიროთ სასაგნე მინაზე

შედეგები:

იღებება მხოლოდ სფინგომიელინი.

§18.4 შპილმეიერის მოდიფიცირებული მეთოდი მიელინის გამოსავლენად

(ფორმალინი, გაყინული ანათლები)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- 2) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- 3) ჰემატოქსილინი
- 4) ქსილოლი

რეაქციის მსვლელობა:

1. 5-15მკმ სისქის ანათლებს ვრეცხავთ 3 პორცია დისტილირებულ წყალში
2. ანათლები გადაგვაქვს ცილით დამუშავებულ სასაგნე მინაზე და ვაშრობთ
3. ვათავსებთ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -ის ნაჯერ ხსნარში, 24-72 საათი, სინათლეში
4. ვრეცხავთ დისტილირებულ წყალში

5. გადაგვაცეს რკინის ამონიუმის სულფატში ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 24 საათი, სიბნელებში
6. ვრეხავთ დისტილირებულ წყალში
7. 24 საათი, სინათლეზე, ვღებავთ ჰემატოქსილინით
8. ვრეცხავთ დისტილირებული წყლის რამდენიმე პორციაში
9. დიფერენცია - 2.5 % -იან რკინის ამონიუმის სულფატში
10. ვრეცხავთ დისტილირებულ და გამდინარე წყალში, 96 % -იან სპირტში, ვაღიავებთ ქსილოლში და ვაფიქსირებთ სასაგნე მინაზე.

შედეგები:

მონაცრისფრო ფონზე მოშავო-მოიისფრო შეფერილობით გამოხატულია მიელინი

§18.4 დებენიერიებადი მიელინის გამოვლენის მეთოდი

(სპირტი ან ფორმალინი, პარაფინიზირებული ანათლები)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) OsO_4
- 2) CCl_4

რეაქციის მსვლელობა:

1. ქსოვილის ნაწილები დავაფიქსირით 95% -იან სპირტში 4 დღით
2. გავაუწყლოვნოთ აბსოლუტურ სპირტში, გავაღიავოთ ქსილოლში და ჩავაყალიბოთ პარაფინში
3. 8 მკ სისქის ანათლები 24 საათით მოვათვსოთ OsO_4 -ის 1% -იან ხსნარში (დამზადებული CCl_4 -ზე)
4. გადავიტანოთ ქსილოლის 2 პორციაში
5. დავაფიქსიროთ სასაგნე მინაზე, შესაბამის სინთეტიკურ არეში

შედეგები:

დეგენერირებადი მიელინი იღებს მოყავისფრო-მოშავო შეფერილობას



სურათი 16. ოსმიუმით შეღებილი ვირთაგვას ნერვის მიელინი განივი და გრძივი განაკვეთის ანათლებში

§18.5 ფოსფოლიპიდების გამოვლენის მეთოდი

(ფორმალინ - კალციუმი, გაყინული ანათლები)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) აცეტონი
- 2) H_2SO_4
- 3) HCl
- 4) ნილის ლურჯის სულფატი (Nile Blue Sulphate)
- 5) HCl

რეაქციის მსვლელობა:

1. ქსოვილი 6-12 საათის განმავლობაში დავაფიქსიროთ და დავამზადოთ გაყინული ანათლები, ჟელატინში ან პოლიეთილენგლიკოლში ჩაყალიბების გარეშე
2. შევლებოთ 90 წუთის განმავლობაში, $t = 70^{\circ}C$, ხსნარით, რომელიც შეიცავს 500მლ ნილის ლურჯის სულფატის (Nile Blue Sulphate) წყალხსნარს და 50მლ 0.5% - იან H_2SO_4 -ს (გამოყენებამდე ვადულოთ 2 საათი)
3. ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით
4. მოვათავსოდ $50^{\circ}C$ -მდე გაცხელებულ აცეტონში და დავტოვოთ მასში 30 წუთის განმავლობაში (ანათლის მოთავსების შემდგომ აცეტონის გაცხელება შევწყვიტოთ)
5. დიფერენციაცია 5% -იან ძმარმჟავაში, 30 წუთი
6. ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით
7. დიფერენციაცია 0.5% -იან HCl -ში, 3 წუთი
8. ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით და დავაფიქსიროთ გლიცერინ - ჟელატინში

შედეგები:

ფოსფოლიფიდები იღებენ ლურჯ შეფერილობას.

თავი XIX

ფერმენტების შეღებვის მეთოდები

§19.1 მონოამინოქსიდაზას გამოვლენის მეთოდი

(ახლად გაყინული ქსოვილის ანათლები, დამზადებული კრიოსტატი და დაბანილი სასაგნე მინაზე)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ტრიპტამინის ჰიდროქლორიდი
- 2) ნატრიუმის სულფატი
- 3) ნიტრო-ლურჯი ტეტრაზოლიუმი
- 4) 0.1მლ ფოსფატის ბუფერი ($\text{pH} = 7.6$)

რეაქციის მსვლელობა:

1. საინკუბაციო არის დამზადება:
 - a. ტრიპტამინის ჰიდროქლორიდი - 25 მგ
 - b. ნატრიუმის სულფატი - 4 მგ
 - c. ნიტრო-ლურჯი ტეტრაზოლიუმი - 5 მგ
 - d. 0.1 მლ ფოსფატის ბუფერი ($\text{pH}=7.6$) - 5 მლ
 - e. დისტირილებული წყალი - 15 მლ
2. ანათლების (10-40 მკ) ინკუბაცია 30-45 წუთი, $t=37^{\circ}\text{C}$
3. რეცხვა 2 წუთის განმავლობაში გამდინარე წყლით
4. 10% -იან ფორმალინში ფიქსირება 24 საათი
5. დავაფიქსიროთ სასაგნე მინაზე გლიცერინ-ჟელატინში

შედეგები:

მოლურჯო, ასევე მეწამული შეფერილობა მიუთითებს მონოამინოქსი-დაზას აქტივობის ლოკალიზაციაზე.

§19.2 სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის გამოვლენის მეთოდი

(ახლად გაყინული ქსოვილის ანათლები, დამზადებული კრიოსტატი და დაბანილი სასაგნე მინაზე)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.2მლ ფოსფატის ფუბერი ($\text{pH} = 7.6$)
- 2) 0.2მლ ნატრიუმის სუქცინატი
- 3) ნიტრო-ლურჯი ტეტრაზოლიუმი (NBT)

რეაქციის მსვლელობა:

1. ძირითადი ხსნარის დამზადება - 0.2მლ ფოსფატის ფუბერს ($\text{pH} 7.6$) + 0.2მლ ნატრიუმის სუქცინატი
2. საინკუბაციო არის დამზადება - 10მლ ძირითად ხსნარს + 10მლ NBT 10% -იანი წყალხსნარი
3. ანათლების ინკუბირება საუნკუბაციო არეში, ჰაერზე, 5-20 წუთი, $t=37^{\circ}\text{C}$
4. 10% -იან ფორმალინ - ფიზიოლოგიურ ხსნარში ფიქსირება, 10 წუთი

5. რეცხვა 15% -იანი სპირტით, 5 წუთი
6. დავაფიქსიროთ სასაგნე მინაზე

შედეგები:

ლურჯი შეფერილობა მიუთითებს სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობაზე.

§19.3 გლუტამატდეჰიდროგენაზას აქტივობის გამოვლენის მეთოდი (ახლად გაყინული ქსოვილის ანათლები, დამზადებული კრიოსტატი და დაბანილი სასაგნე მინაზე)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) 0.08-0.4მლ 1მლ L-გლუტამატის ნატრიუმის მარილი (187მგ/1მლ), pH 7.4
- 2) ძირითადი ხსნარი: 10მლ 0.2მლ Tris-HCl, pH 7.4 ან PBS + 10მლ 0.2-0.8% NBT + 4მლ 0.13% KCN (0.02M, pH7.4) + 4მლ 2% MgCl₂ + 8მლ H₂O
- 3) NAD⁺ ან NADP⁺
- 4) ფენაზინმეტასულფატი
- 5) ჟელატინი, აგარი ან აგაროზა

რეაქციის მსვლელობა:

1. საინკუბაციო არის დამზადება: 2მლ ძირითად ხსნარს + 2-4მგ NAD ან NADP + 0.1-1მგ ფენაზინმეტასულფატი
2. მიღებული ხსნარი უნდა გაიფილტროს
3. უნდა დამზადდეს ჟელატინის 20% ან აგაროზას (ან აგარის) 2% ხსნარი დისტილატზე. ამისთვის ჟელატინი იხსნება 37-50°C-ზე, ხოლო აგაროზა (ან აგარი) 80-90°C-ზე. ხსნარის pH უნდა მერყეობდეს 7.2 -დან 7.6-მდე
4. საინკუბაციო არე კარგად უნდა შევურიოთ ჟელატინის ხსნარს (ან აგაროზას), რის შემდეგაც უნდა დავიტანოთ სასაგნე მინაზე
5. ინკუბაცია ჟელატინის შემთხვევაში 30-90წთ, ოთახის ტემპერატურაზე; ხოლო აგაროზას შემთხვევაში 15-60წთ, 37°C-ზე. ორივე შემთხვევაში სიბნელეში ან ინფრაწითელი განათების პირობებში.
6. დავაფიქსიროთ საფარი მინით.

შედეგები:

ლურჯი შეფერილობა მიუთითებს გლუტამატდეჰიდროგენაზას აქტივობაზე.

§19.4 ციტოქრომ C - ოქსიდაზას აქტივობის გამოვლენის მეთოდი (ახლად გაყინული ქსოვილის ანათლები, დამზადებული კრიოსტატი და დაბანილი სასაგნე მინაზე)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) N-ფენილ-N-ფენილენდიამინი (N-ამინოდიფენილამინი)
- 2) 1-ჰიდროქსი-2-ნაფტოლის მჟავა ან ნაფტოლი AS-LG
- 3) ეთანოლი
- 4) 0.05მლ PBS ან Tris-HCl (pH 7.2)
- 5) კობალტის ნიტრატი ან კობალტის აცეტატი

რეაქციის მსვლელობა:

1. საინკუბაციო არე: 10-15მგ N-ამინოდოფენილამინი + 10-15მგ 1-ჰიდროქსი-2-ნაფტოლის მჟავა ან ნაფტოლი AS-LG იხსნება 0.5მლ აბსოლუტურ ეთანოლში.
2. იფილტრება და დაიტანება ანათალზე
3. ინკუბაცია 30-120წთ, 37°C
4. გადავიტანოთ ანათლები (პირდაპირ) კობალტის ნიტრატის ან კობალტის აცეტატის 1% -იან ხსნარში (დამზადებული 4%-იან ფორმალდეჰიდზე), 30-60წთ.
5. გადარეცხვა დისტილირებული წყლით
6. დავაფიქსიროთ სასაგნე მინაზე გლიცერინის გელში.

შედეგები:

მოლურჯო-ყავისფერი ან მოყავისფრო-მოშავო შეფერილობა მიუთითებს ციტოქრომ C - ოქსიდაზას აქტივობაზე.

თავი XX

თავის ტვინის უჩრედების შეღებვის მეთოდები

§20.1 ფონტანა-მასონის მეთოდი მელანიზის გამოსავლენად

(სხვადასხვა ფისქატორები, რომლებიც არ შეიცავენ ქრომის მარილებს; პარაფინიზირებული ანათლები)

საჭირო რეაქტივები:

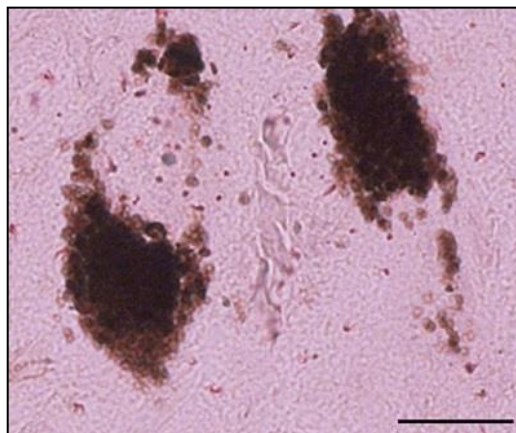
- 1) რეაქტივი A - $[Ag(NH_3)_2]OH$ - ის ხსნარი 30 მლ (ტოლენსის რეაქტივი)
- 2) რეაქტივი B - $KMnO_4$ 18 მლ
- 3) რეაქტივი C - გამააქტივებული მუავა ბუფერი 18 მლ
- 4) რეაქტივი D - მუაუნმუავას ხსნარი 30 მლ
- 5) რეაქტივი E - ნატრიუმის თიოსულფატის ხსნარი 30 მლ
- 6) რეაქტივი F - მაიერის კარმალუმი 30 მლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. ავირჩიოთ ერთი პრეპარატის 2 ანათალი, რომელთაგან ერთ-ერთი იქნება საკონტროლო
2. საკონტროლო ანათალს დავამატოთ 10 წვეთი რეაქტივი B და 10 წვეთი რეაქტივი C, დავაცოვნოთ 20 წუთი
3. ჩამოვრეცხოთ გამოხდილი წყლით
4. საკონტროლო ანათალს დავამატოთ 10 წვეთი რეაქტივი D და დავაცოვნოთ 5 წუთი
5. ჩამოვრეცხოთ გამოხდილი წყლით
6. საინკუბაციო კონტეინერში მოვათავსოთ, როგორც საკონტროლო, ისე საცდელი ანათლები
7. ორივე ანათალს დავამატოთ 10 წვეთი რეაქტივი A, დავხუროთ კონტეინერი და დავაცოვნოთ 12 საათი
8. ჩამოვრეცხოთ გამოხდილი წყლით
9. ორივე ანათალს დავამატოთ 10 წვეთი რეაქტივი E და დავაცოვნოთ 5 წუთი
10. ჩამოვრეცხოთ გამოხდილი წყლით
11. ორივე ანათალს დავამატოთ 10 წვეთი რეაქტივი F და დავაცოვნოთ 5 წუთი
12. ჩამოვრეცხოთ გამოხდილი წყლით
13. დეჰიდრატაცია აღმავალ სპირტებში (50-70-96-100%)
14. გავალიავოთ ქსილოლში
15. დავფაროთ საფარი მინით

შედეგები:

საცდელ ანათლებში მელანიზი იღებს მოშავო შეფერილობას; საკონტროლო ანათლებში კი აღნიშნული არ დაიკვირვება. ბირთვები იღებენ წითლად. მოლეკულურ ფსიქიატრიაში გამოიყენება ნეირომელანიზმის შემცველი სტრუქტურების, მაგ. შავი სუბსტანციის შესასწავლად.



სურათი 17. ფონტანა-მასონის მეთოდით შეღებილი შავი სუბსტანციის ნეირონები.

§20.2 ბალმის მეთოდი

პირთაგვას ჰიპოფიზის ბაზოფილების გამოსავლენად

(ავტორი რეკომენდირებს ბუნის რეაქტივის გამოყენებას, რომელშიც ძმარმუაჰა ჩანაცვლებულია 0.5% -იანი ტრიქლორძმარმუაჰით. მეთოდი გამოიყენება მხოლოდ პირთაგვას ჰიპოფიზის შესასწავლად)

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ლუგოლის ხსნარი
- 2) ალდეჰიდ-ფუქსინი
- 3) ერლინის ჰემატოქსილინი
- 4) Light green SF
- 5) Orange G
- 6) ფოსფორვოლფარმის მუაჰა
- 7) ძმარმუაჰა

რეაქციის მსვლელობა:

1. მივიყვანოთ დეფარაფინირებული ანათლები წყლამდე
2. მოვათავსოთ ლუგოლის ხსნარში 30 წუთი
3. იოდის მოსაცილებლად, 2 წუთის განმავლობაში მოვათავსოთ ნატრი-უმის თიოსულფატის 5% -იან წყალხსნარში
4. ანათლები ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით
5. შევლებოთ ალდეჰიდფუქსინით (3-10 დღის) 2-10 წუთის განმავლობაში
6. ჩამოვრეცხოთ 95% -იანი ეთანოლის 2 პორციით და დავტოვოთ მე-3 პორციაში 5-10 წუთი
7. ჩამოვრეცხოთ 70% -იანი ეთანოლით და შემდეგ გამოხდელი წყლით
8. შევლებოთ ერლინის ჰემატოქსილინით 3-4 წუთი
9. ჩამოვრეცხოთ დისტილირებული წყლით
10. დიფერენციაცია 0.5% -იან შემუაჰიანებულ სპირტში
11. რეცხვა გამდინარე წყალში ანათლის გალურჯებამდე
12. დამატებითი შეღებვა საღბავ light green SF -ის 0.2% -იან წყლახსნარში, რომელსაც დამატებული აქვს orange G -ის 1% -იანი ხსნარი, ფოსფორ-ვოლფარმის მუაჰას 0.5% -იანი ხსნარი და 1% -იანი ძმარმუაჰა (45 წამი)
13. სწრაფად ჩამოვრეცხოთ ძმარმუაჰისა და სპირტის 0.2% -იან ხსნარში
14. გაუწყლოვნება აბსოლუტური სპირტის 2 პორციაში და გალიაგება ქსილოლით
15. სასაგნე მინაზე დაფიქსირება, შესაბამისი სინთეტიკური ფისით

შედეგები:

ვირთაგვას ჰიპოფიზის **β** უჯრედების გრანულები იღებენ მუქ - მეწამულ, **δ** უჯრედების გრანულები - მწვანე, ხოლო **α** უჯრედების გრანულები - ნარინჯისფერ შეფერილობას.

§20.3 კრეზილ-იისფრით შეღებვის მეთოდი ნისლის სუბსტანციის გამოსავლენად

საჭირო რეაქტივები:

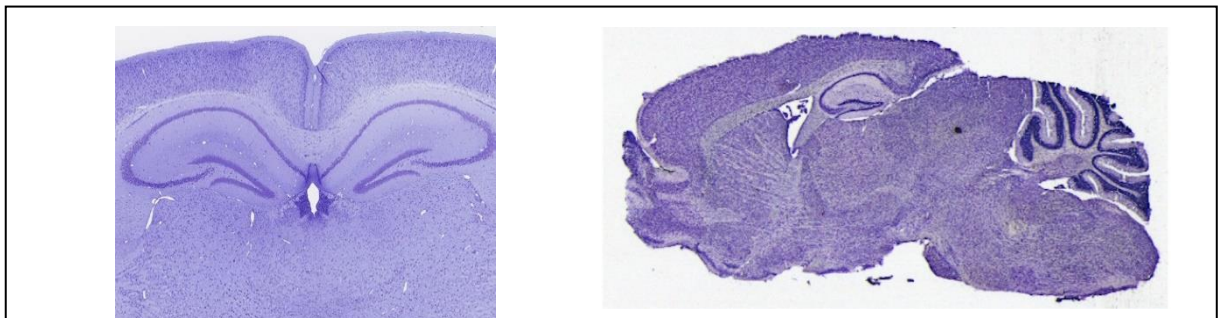
- 1) რეაქტივი A - $[Ag(NH_3)_2]OH$ - ის ხსნარი 30 მლ (ტოლენსის რეაქტივი)
- 2) რეაქტივი B - $KMnO_4$ 18 მლ
- 3) რეაქტივი C - გამააქტივებული მუავა ბუფერი 18 მლ
- 4) რეაქტივი D - მჟაუნმჟავას ხსნარი 30 მლ
- 5) რეაქტივი E - ნატრიუმის თიოსულფატის ხსნარი 30 მლ
- 6) რეაქტივი F - მაიერის კარმალუმი 30 მლ

რეაქციის მსვლელობა:

1. ქსოვილი დავაფიქსიროთ კარნუას ფიქსატორში: 6 წილი აბსოლუტური სპირტი + 3 წილი ქლოროფორმი + 1 წილი ცინულოვანი ძმარმჟავა. 2-3 საათი
2. გადავიტანოთ ქლოროფორმის სპირტხსნარში (50მლ ქლოროფორმი + 50მლ სპირტი), ჩაძირვამდე
3. გადავიტანოთ სუფთა ქლოროფორმის ორ პორციაში, 12სთ
4. გადავიტანოთ პარაფინ-ქლოროფორმში (1:2), $t = 42^\circ C$, 12-24 სთ
5. გადავიტანოთ პარაფინ-ქლოროფორმში (1:1), $t = 42^\circ C$, 12-24 სთ
6. გადავიტანოთ პარაფინ-ქლოროფორმში (2:1), $t = 42-50^\circ C$, 4-12 სთ
7. გადავიტანოთ პარაფინში (100%), $t = 56^\circ C$, 1-2 სთ
8. დავამზადოთ პარაფინიზირებული ანათლები
9. მოვახდინოთ დეპარაფინიზაცია და მივიწვანოთ წყლამდე
10. შევღებოთ კრეზილ-იისფერის (Crezyl-Violet) 0.1% -იან ხსნარში, 3-10 წუთი ან 0.5-1 წთ 0.5% -იან ხსნარში. ($37-50^\circ C$ ფარგლებში გამთბარი ხსნარი ზრდის ღებვის ერთგვაროვნებას)
11. ჩამოვრეცხოთ გამოხდილი წყლით
12. გადავიტანოთ ორ პორცია შემჟავებულ სპირტში (96% -იანი ეთანოლი + რამდენიმე წვეთი ძმარმჟავა)
13. შემდეგ, ორ პორცია ქსილოლში
14. ქსილოლით წინასწარ დამუშავებულ, მშრალ სასაგნე მინაზე ვაფიქსირებთ ანათალს კანადის ბალზამით და ვფარავთ საფარი მინით

შედეგები:

ნეირონები (ნისლის სუბსტანცია) იღებს მოიისფრო შეფერილობას.



სურათი 18. კრეზილ-იისფრით შეღებული თავის ტვინი

§20.4 ბოლჯის ორიგინალური მეთოდი

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფორმალინი (10%)
- 2) OsO_4
- 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- 4) ვერცხლის ნიტრატი
- 5) გლუკოზას 20%-იანი ხსნარი
- 6) ცელოიდინი
- 7) ევკალიპტის ზეთი

რეაქციის მსვლელობა:

1. ქსოვილი, სისქით არაუმეტეს 3-3.5მმ, დავაფიქსიროთ 10% -იან ფორ-მალინში 1-15 დღე (+15 დღე ფიქსირება აუარესებს შეღებვის ხარისხს)
2. გარეცხვის გარეშე გადაგვაქ მიუღერის რეაქტივში, თერმოსტატში, 78სთ
3. ვათავსებთ ფიქსატორში, რომელიც შეიცავს: 5მლ 1% -იანი ოსმიუმის ტეტრაოქსიდი (OsO_4) + 25მლ 3% -იანი კალიუმის ბიქრომატი ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). ქსოვილს და აღნიშნულ ფიქსატორს ვათავსებთ მოშლიფულ ბიუქსში, თერმოსტატში, $t = 37^\circ\text{C}$, 48სთ
4. ქსოვილი ირეცხება 2 პორცია 1% -იან ვერცხლის ნიტრატში, რომელიც დამზადებულია 20% გლუკოზას ხსნარზე
5. ქსოვილი გადაგვაქვს მუქ ჭურჭელში, რომელშიც ვამატებთ 40-50მლ ვერცხლის ნიტრატის ხსნარს. იმპრეგნაცია საჭიროებს 14-20 დღეს და სითბოს. ხაზგასასმელია, რომ მანიპულირება დასაშვებია მხოლოდ მინის ან პლასტმასის ინსტრუმენტებით, დაუშვებელია მეტალი.
6. ამის შემდგომ, ხდება აღმავალ სპირტებში გატარება: 2 პორცია 70% -იანი - 15-15 წუთი; 2 პორცია 90% -იანი - 30-30 წუთი; 2 პორცია 100% -იანი - 1-1სთ; სპირტი + ეთერი - 30წუთი; თხიერი ცელოიდინი (4-5%) - 1.5სთ; საშუალო ცელოიდინი (6-7%) - 1სთ; ბლანტი ცელოიდინი (10-11%) - 12 საათი.
7. მზადდება ბლოკები და მიიღება ანათლები
8. თითოეული ანათალი ირეცხება 96% სპირტში, რის შემდგომაც თავსდება 100% სპირტში 30წთ
9. ღიავდება ევკალიპტის გაფილტრულ ზეთში, ფიქსირდება სასაგნე მინაზე კანადის ბალზამით

შედეგები:

ღია-ყვითელ ფონზე გამოხატულია შავად იმპრეგნირებული ნეირონები, დენდრიტებითა და აქსონებით.

§20.5 ბოლჯი-კოპსის მეთოდი

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფორმალინი (10%)
- 2) OsO_4
- 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- 4) ვერცხლის ნიტრატი
- 5) გლუკოზას 20%-იანი ხსნარი
- 6) ცელოიდინი
- 7) ევკალიპტის ზეთი

რეაქციის მსვლელობა:

1. თავის ტვინის ნაწილები ირეცხება თბილ, იზოტონურ NaCl -ის ხსნარში და თავსდება ხსნარში, რომელიც შეიცავს: 20მლ 5% -იანი კალიუმის ბი-ქრომატი + 20მლ 5% -იანი სულემის ხსნარი + 40მლ დისტილირებული წყალი. აღნიშნულ ხსნარს მუდმივი მორევით ემატება 8მლ 5% -იანი კალიუმის ბიქრომატი
2. ანათლები და ხსნარი თავსდება მუქ ჭურჭელში და ინახება 8 კვირამდე
3. ანათლები ირეცხება აცეტონისა და აბსოლუტური სპირტის ხსნარში (50-50%) და შემდეგ თავსდება აღნიშნულ ხსნარში 24სთ, დახურულ ჭურჭელში
4. ანათლები გადაგვაცვს ხსნარში რომელიც შეიცავს სპირტისა და ეთერის თანაბარ მოცულობას, 4სთ
5. ანათლები თავსდება 5% -იან ცელოდიინში 24სთ, შემდეგ 12% -იან ცელოდიინში და შემდეგ ხორციელდება ჩაყალიბება
6. მზადდება 100-120მკ სისქის ანათლები
7. ანათლები მიგვყავს დისტილირებულ წყალამდე
8. ანათლებს ვათავსებთ 5% -იან კალიუმის სულფატის ხსნარში, რომელიც შემჟავიანებულია მჟაუშუავას რამდენიმე წვეთით
9. რეცხვა დისტილირებული წყლით, 5წთ
10. გადაგვაცვს აღმავალ სპირტებში და ვაფიქსირებთ სასაგნე მინაზე 1% -იანი ცელოდიინით
11. ღიავდება და ფიქსირდება სასაგნე მინაზე

შედეგები:

ღია-ყვითელ ფონზე გამოხატულია შავად იმპრეგნირებული ნეირონები, დენდრიტებითა და აქსონებით.

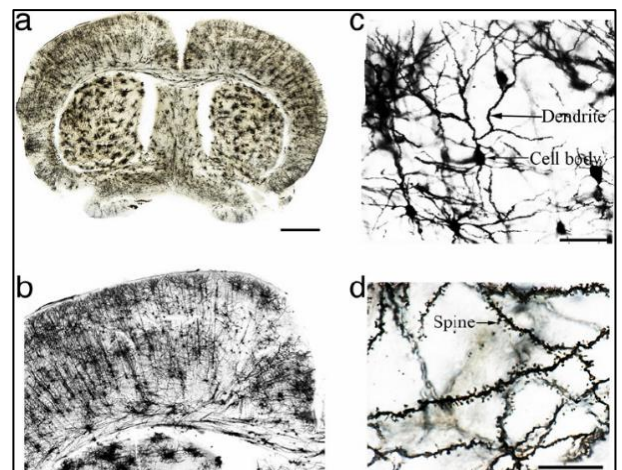
§20.6 გლისის მეთოდი პლაზმიროზას მოდიფიკაციით

საჭირო რეაქტივები:

- 1) ფორმალინი (10%)
- 2) OsO_4
- 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- 4) ვერცხლის ნიტრატი
- 5) გლუკოზას 20%-იანი ხსნარი
- 6) ცელოდიინი
- 7) ევკალიპტის ზეთი

რეაქციის მსვლელობა:

1. თავის ტვინის ნაწილს ათავსებენ ბოდიანის სითხეში, 3-4 დღით
2. ანათლები ირეცხება გამდინარე წყალში 24სთ
3. 12-15მკმ სისქის ანათლები, რომლებიც მიღებულია კრიოსტატში, ირეცხება დისტილირებული წყლით და თავსდება 50% -იან სპირტში, რომელსაც დამატებული აქვს 10 წვეთი ამიაკი, 24სთ
4. ანათლები ირეცხება დისტილირებული წყლით და თავსდება 10% -იან ვერცხლის ნიტრატში, რამდენიმე საათიდან - 5 დღემდე (მანამ, სანამ ანათალი არ გაყავისფრდება)
5. პირდაპირ გადაგვაცვს 10% -იანი ფორმალინის რამდენიმე პორციაში
6. ირეცხება გამდინარე წყალში



სურათი 19. გოლჯი-კოქსის მეთოდით შეღებილი თავის ტვინი.

7. 30-60 წმ თავსდება ხსნარში, რომელიც შეიცავს 10მლ 100% -იანი სპირტი + 10მლ 20% -იანი ვერცხლის ნიტრატი (ნალექს ხსნიან რამდენიმე წვეთი ამიაკის დამატებით)
8. გადაგვაცვს 10% -იან ფორმალინში
9. ვრეცხავთ დისტილირებული წყლით და გადაგვაცვს AuCl_3 -ის 1% -იან ხსნარში
10. გადაგვაცვს ნატრიუმის თიოსულფატის 5% -იან ხსნარში
11. ვრეცხავთ დისტილირებული წყლით
12. გადაგვაცვს სასაგნე მინაზე, ვაშრობთ ჰაერზე, ვატარებთ აცეტონში, ქსილოლში და ვაფიქსირებთ შესაბამის არეში

შედეგები:

იღებება ნერვული უჯრედები, ბირთვები, ნეიროფიბრილები და სინაპსური დაბოლოვებები.

§20.7 რამონ-ი-კახალის მეთოდი ფიბროზული ასტროციტების გამოსავლენად

(ფიქსირება 10% -იან ფორმალინში, გაყინული ანათლეები)

საჭირო რეაქტივები:

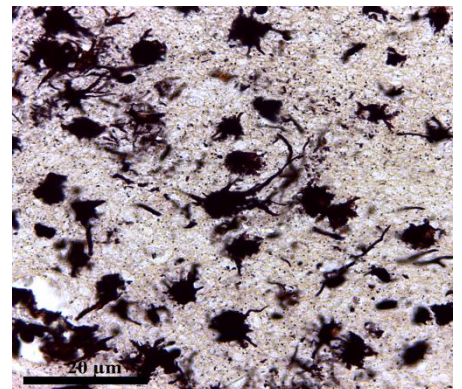
- 1) HgCl_2
- 2) AuCl_3
- 3) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 4) ქსილოლი
- 5) ამონიუმის ბრომიდი

რეაქციის მსვლელობა:

1. 8-10მკმ სისქის ანათლეები ირეცხება 3 პორცია დისტილირებულ წყალში და 48 საათით გადა-გვაცვს ბრომირებულ ფიქსატორში (14მლ ნეიტრალური ფორმალინი + 2გ ამონიუმის ბრომიდი + 100მლ გამომხდელი წყალი)
2. ვრეცხავთ 3 პორცია დისტილირებულ წყალში და გადაგვაცვს ოქროს ტრიქლორიდისა და ვერცხლისწყლის დიქლორიდის წყალხსნარში (8მლ 5% HgCl_2 + 10მლ 1% AuCl_3 + 60მლ H_2O), 24 საათით, სიბნელეში
3. ვრეცხავთ 3 პორცია დისტილირებულ წყალში და ვათავსებთ ნატრი-უმის თიოსულფატის ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 5% -იან ხსნარში, 1 წუთი
4. გადაგვაცვს დისტილირებულ წყალში, ვაფიქსირებთ ცილითა და გლიცერინით დამუშავებულ სასაგნე მინაზე და ვაშრობთ ჰაერზე
5. ვაღიაგებთ ქსილოლში და ვაფიქსირებთ შესაბამის არეში საფარი მინის ქვეშ

შედეგები:

თეთრ ნივთიერებაში, იისფერ ფონზე, გამოხატულია მოშავო შეფერილობის ფიბროზული ასტროციტები, ხოლო რუხ ნივთიერებაში - შედარებით ღია.



სურათი 20. რამონ-ი-კახალის მეთოდით შეღებილი ასტროციტები

დანართი №1
წიგნში გამოყენებულ ნივთიერებათა
მოლეკულური მასების ცნობარი

ნივთიერება	ფორმულა	მოლეკულური მასა
6- hydroxydopamine	იხ. 6-OHDA	
6-OHDA	$C_8H_{11}NO_3$	169.18
8-OH-DPAT	$C_{16}NH_{25}O$	247.38
Adenosine triphosphate	იხ. ATP	
Aluminum	Al	26.98
Ammonium molybdate	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1163.79
Amphetamine	$C_9H_{13}N$	135.21
Ascorbic Acid	$C_6H_8O_6$	176.12
Ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	176.12
ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	507.18
Caesium chloride	CsCl	168.36
Clomipramine	$C_{19}H_{23}ClN_2$	314.90
Colchicine	$C_{22}H_{25}NO_6$	399.44
Copper(II) sulfate	$CuSO_4$	159.61
Corticosterone	$C_{21}H_{30}O_4$	346.47
Dimethyl sulfoxide	იხ. DMSO	
Dipotassium phosphate	K_2HPO_4	174.2
Disodium phosphate	Na_2HPO_4	141.96
Dithiothreitol	იხ. DTT	
DMSO	C_2H_6OS	78.13
DOI	$C_{11}H_{16}INO_2$	321.15
DTT	$C_4H_{10}O_2S_2$	154.25
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292.24
Ethanol	C_2H_6O	46.07

ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	380.35
Ethylenediaminetetraacetic acid	ob. EDTA	
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16
Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	92.09
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238.30
Heptane	C ₇ H ₁₆	100.21
Hydrochloric Acid	HCl	36.46
Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂	34.01
INT	C ₁₉ H ₁₃ ClIN ₅ O ₂	505.70
Iodonitrotetrazolium chloride	ob. INT	
Iron(II) sulfate	FeSO ₄	151.90
Isocitric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192.12
Isopropyl	C ₃ H ₈ O	60.1
Ketamine	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	237.73
Lithium Sulfate	Li ₂ SO ₄	109.94
Magnesium chloride	MgCl ₂	95.21
Magnesium sulfate	MgSO ₄	120.37
Monopotassium phosphate	KH ₂ PO ₄	136.09
Monosodium phosphate	NaH ₂ PO ₄	119.98
MPTP	C ₁₂ H ₁₅ N	173.25
MTT	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S	414.32
N-(1 Naphthyl) ethylenediamine	ob. NEDA	
NaCl	NaCl	58.44
NADH	ob. Nicotinamide adenine dinucleotide	
NADPH	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃	744.41

NEDA	$C_{12}H_{14}N_2$	186.26
Nicotinamide adenine dinucleotide	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$	663.43
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	об. NADPH	
Nitro blue Tetrazolium Chloride (NBT)	$C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$	817.64
Paraquat	$C_{12}H_{14}Cl_2N_2$	257.16
PCP	$C_{17}H_{25}N$	243.39
phenazine methosulfate (PMS)	$C_{14}H_{14}N_2O_4S$	306.34
Phencyclidine	об. PCP	
Phenolphthalein	$C_{20}H_{14}O_4$	318.32
Phosphoric acid	H_3PO_4	97.99
PMS	об. phenazine methosulfate	
Potassium chloride	KCl	74.55
Potassium ferricyanide	$K_3[Fe(CN)_6]$	329.24
Potassium iodide	KI	166.00
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302.24
Quinpirole	$C_{13}H_{21}N_3$	219.33
Reserpine	$C_{33}H_{40}N_2O_9$	608.68
Rotenone	$C_{23}H_{22}O_6$	394.41
Scopolamine	$C_{17}H_{21}NO_4$	303.35
Sodium azide	Na_3N	65.01
Sodium Carbonate	Na_2CO_3	105.99
Sodium Hydroxide	NaOH	40.00
Sodium Molybdate	Na_2MoO_4	205.92
Sodium nitrite	$NaNO_2$	69.00
Sodium Potassium Tartrate	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	282.1

Sodium pyruvate	$C_3H_3NaO_3$	110
Sodium Tartrate	$C_4H_4Na_2O_6$	194.05
Sodium tungstate	Na_2WO_4	293.82
Streptozotocine	$C_8H_{15}N_3O_7$	265.22
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30
Sulfonamide	$C_{22}H_{23}N_3O_5S$	441.5
TBA	$C_4H_{10}O$	74.12
TCA	$C_2HCl_3O_2$	163.38
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	$C_6H_{16}N_2$	116.24
Tertiary butyl alcohol	ob. TBA	
TMP	$C_9H_{19}N$	141.25
Trichloroacetic acid	ob. TCA	
Tris	$C_4H_{11}NO_3$	121.14
Trisodium citrate	$Na_3C_6H_5O_7$	258.06
Valproic acid	$C_8H_{16}O_2$	144.21
Vanadium(III) chloride	VCl_3	157.3
Vitamin C	ob. Ascorbic Acid	
Zinc Sulfate	$ZnSO_4$	161.47
2,2,6,6-Tetramethylpiperidine	ob. TMP	
2,4-Dinitrophenylhydrazine	ob. 2,4-DNPH	
2,4-DNPH	$C_6H_6N_4O_4$	198.14
2.5 dimethoxy- iodoamphetamine	ob. DOI	
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide	ob. MTT	

დანართი №2
გუფერული ხსნარები

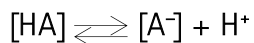
ბუფერის pH გამოითვლება ჰენდერსონ-ჰაზელბახის (Henderson-Hasselbach) ფორმულით:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$

სადაც:

$[\text{A}^-]$ — ფუძის ექვივალენტური კონცენტრაცია

$[\text{HA}]$ — მჟავას ექვივალენტური კონცენტრაცია



**ფოსფატური ბუფერი $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$
(0.1M), pH = 5.8 - 8.0**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ M.W = 178.05; 0.2მოლ = 35.61გ / 1000მლ

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ M.W = 156.02; 0.2მოლ = 31.204გ / 1000მლ

pH (25°C)	0.2მოლ Na_2HPO_4 (მლ)	0.2მოლ NaH_2PO_4 (მლ)	
5.8	8.0	92.0	ბავდება 200მლ -მდე
6.0	12.3	87.7	ბავდება 200მლ -მდე
6.2	18.5	81.5	ბავდება 200მლ -მდე
6.4	26.5	73.5	ბავდება 200მლ -მდე
6.6	37.5	62.5	ბავდება 200მლ -მდე
6.8	49.0	51.0	ბავდება 200მლ -მდე
7.0	61.0	39.0	ბავდება 200მლ -მდე
7.2	72.0	28.0	ბავდება 200მლ -მდე
7.4	81.0	19.0	ბავდება 200მლ -მდე
7.6	87.0	13.0	ბავდება 200მლ -მდე
7.8	91.5	8.5	ბავდება 200მლ -მდე
8.0	94.7	5.3	ბავდება 200მლ -მდე

Phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl M.W = 58.44; 5მოლ = 292.2გ / 1000მლ

KCl M.W = 74.55; 1მოლ = 74.55გ / 1000მლ

Na_2HPO_4 M.W = 141.96; 1მოლ = 141.96გ / 1000მლ

KH_2PO_4 M.W = 136.09; 1მოლ = 136.09

რეაქტივი	სამუშაო ხსნარის კონცენტრაცია	საბოლოო კონცენტრაცია	(მლ) / 1000მლ
NaCl	5მოლ	137მმოლ	27.4
KCl	1მოლ	2.7მმოლ	2.7
Na_2HPO_4	1მოლ	10მმოლ	10
KH_2PO_4	1მოლ	1.8მმოლ	1.8

ფოსფატური ბუფერი KH_2PO_4 / Na_2HPO_4
(0.2M), pH = 5.7 - 8.0

1000მლ H_2O (0.2M)		pH
KH_2PO_4	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
22.4	3.49	5.7
22.08	4.29	5.8
21.60	5.37	5.9
21.05	6.60	6.0
20.40	8.05	6.1
19.56	9.93	6.2
18.60	12.07	6.3
6.417.64	14.22	6.4
16.44	16.90	6.5
15.00	20.12	6.6
13.56	23.34	6.7
12.24	26.29	6.8
10.80	29.51	6.9
9.36	32.73	7.0
7.92	35.95	7.1
6.72	38.63	7.2
5.52	41.31	7.3
4.56	43.46	7.4
3.84	45.07	7.5
3.12	46.68	7.6
2.52	48.55	7.7
2.04	49.09	7.8
1.68	49.89	7.9
1.27	50.81	8.0

KCl / HCl, pH = 1.0 - 2.2

KCl M.W = 74.5; 0.1მოლ = 7.45გ / 1000მლ

pH	0.1მოლ KCl (მლ)	HCl (მლ)	
1.0	50	97.0	ივსება 100მლ -მდე
1.2	50	64.5	ივსება 100მლ -მდე
1.4	50	41.5	ივსება 100მლ -მდე
1.6	50	26.3	ივსება 100მლ -მდე
1.8	50	16.6	ივსება 100მლ -მდე
2.0	50	10.6	ივსება 100მლ -მდე
2.2	50	6.4	ივსება 100მლ -მდე

KH₂PO₄ / NaOH (0.05M), pH = 5.8 - 8.0

KH₂PO₄ M.W = 136.09; 0.2მლ = 27.22გ / 1000მლ

pH (25°C)	0.2მლ KH ₂ PO ₄ (მლ)	0.2N NaOH (მლ)	
5.8	5	0.36	ზავდება 20მლ -მდე
6.0	5	0.56	ზავდება 20მლ -მდე
6.2	5	0.81	ზავდება 20მლ -მდე
6.4	5	1.16	ზავდება 20მლ -მდე
6.6	5	1.64	ზავდება 20მლ -მდე
6.8	5	2.24	ზავდება 20მლ -მდე
7.0	5	2.91	ზავდება 20მლ -მდე
7.2	5	3.47	ზავდება 20მლ -მდე
7.4	5	3.91	ზავდება 20მლ -მდე
7.6	5	4.24	ზავდება 20მლ -მდე
7.8	5	4.45	ზავდება 20მლ -მდე
8.0	5	4.61	ზავდება 20მლ -მდე

10x Tris Buffered Saline (TBS)

რეაქტივი	საბოლოო კონცენტრაცია	გ / 1000მლ
Tris-Base	200მმლ	24.228
NaCl	1.5მლ	87.7

10x Tris-Base-Borate-EDTA (TBE)

რეაქტივი	საბოლოო კონცენტრაცია	გ / 1000მლ
Tris-Base	1მლ	121.1
ბორისმჟავა	1მლ	61.8
Na ₂ EDTA · H ₂ O	20მმლ	7.4

Tris-EDTA (TE), pH = 7.4 - 8.0

Tris-HCl M.W = 121.14; 1მლ = 121.14გ / 1000მლ

EDTA M.W = 292.24; 500მმლ = 147.12გ / 1000მლ

რეაქტივი	სამუშაო ხსნარის კონცენტრაცია	საბოლოო კონცენტრაცია	მლ / 1000მლ
Tris-HCl (pH = 7.4-8.0)	1მლ	10მმლ	10
EDTA (pH = 8.0)	500მმლ	1მმლ	2

Tris / Tris-HCl (1M), pH = 7.2 - 9.0

pH			1000მლ H ₂ O (1M)	
5°C	25°C	37°C	Tris (გ)	Tris-HCl (გ)
7.76	7.20	6.91	13.4	140.4
7.89	7.30	7.02	16.0	137.0
7.97	7.40	7.12	19.4	132.2
8.07	7.50	7.22	23.6	127.0
8.18	7.60	7.30	27.8	121.2
8.26	7.70	7.40	33.2	114.4
8.37	7.80	7.52	39.4	106.4
8.48	7.90	7.62	46.0	97.6
8.58	8.00	7.71	53.0	88.8
8.68	8.10	7.80	59.4	80.4
8.78	8.20	7.91	66.8	70.8
8.88	8.30	8.01	74.0	61.4
8.98	8.40	8.10	80.6	52.8
9.09	8.50	8.22	87.2	44.2
9.18	8.60	8.31	93.0	36.6
9.28	8.70	8.42	98.0	30.0
9.36	8.80	8.51	102.6	24.6
9.47	8.90	8.62	106.4	19.2
9.56	9.00	8.70	109.4	15.2

Tris-EDTA-NaCl (TEN)

Tris-HCl M.W = 121.14; 1მლ = 121.14გ / 1000მლ
 EDTA M.W = 292.24; 500მმლ = 147.12 / 1000მლ
 NaCl M.W = 58.44; 5მლ = 292.2გ / 1000მლ

რეაქტივი	სამუშაო ხსნარის კონცენტრაცია	საბოლოო კონცენტრაცია	მლ / 1000მლ
Tris-HCl (pH = 8.0)	1მლ	40მმლ	40
EDTA (pH = 8.0)	500მმლ	1მმლ	2
NaCl	5მლ	150მმლ	30

HEPES buffer saline (HBS)

NaCl M.W = 58.44; 5მოლ = 292.2გ / 1000მლ
 Na₂HPO₄ M.W = 119.98; 1მოლ = 119.98გ / 1000მლ
 HEPES M.W = 238.30; 1მოლ = 238.30 / 1000მლ
 KCl M.W = 74.5; 1მოლ = 74.5გ / 1000მლ
 D-Glucose M.W = 180.156; 1მოლ = 180.156გ / 1000მლ

რეაქტივი	სამუშაო ხსნარის კონცენტრაცია	საბოლოო კონცენტრაცია	(მლ) / 1000მლ
NaCl	5M	270მმოლ	54
Na ₂ HPO ₄	1M	1.5მმოლ	1.5
HEPES	1M	40მმოლ	40
KCl	1M	10მმოლ	10
D-Glucose	1M	10მმოლ	10

გლიცინი / HCl, pH = 2.2 - 3.6

გლიცინი M.W = 75.07; 0.2მოლ = 1.501გ / 100მლ

pH	0.2მოლ გლიცინი (მლ)	HCl (მლ)	
2.2	25	22.0	ივსება 100მლ -მდე
2.4	25	16.2	ივსება 100მლ -მდე
2.6	25	12.1	ივსება 100მლ -მდე
2.8	25	8.4	ივსება 100მლ -მდე
3.0	25	5.7	ივსება 100მლ -მდე
3.2	25	4.1	ივსება 100მლ -მდე
3.4	25	3.2	ივსება 100მლ -მდე
3.6	25	2.5	ივსება 100მლ -მდე

20x Saline Sodium Citrate (SSC)

რეაქტივი	საბოლოო კონცენტრაცია	გ / 1000მლ
NaCl	3მოლ	175.2
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	300მმოლ	88

ლიმონმჟავა / ნატრიუმის ციტრატი
(0.1M), pH = 3.0 - 6.2

ლიმონმჟავა · H₂O M.W = 210.14; 0.1მოლ = 21.01გ / 100მლ

ნატრიუმის ციტრატი · 2H₂O M.W = 294.12; 0.1მოლ = 29.4გ / 1000მლ

pH (25°C)	0.1მოლ ლიმონმჟავა (მლ)	0.1მოლ ნატრიუმის ციტრატი (მლ)
3.0	16.4	3.6
3.2	15.5	4.5
3.4	14.6	5.4
3.6	13.7	6.3
3.8	12.7	7.3
4.0	11.8	8.2
4.2	10.8	9.2
4.4	9.9	10.1
4.6	8.9	11.1
4.8	8.0	12.0
5.0	7.0	13.0
5.2	6.1	13.9
5.4	5.1	14.9
5.6	4.2	15.8
5.8	3.2	16.8
6.0	2.3	17.7
6.2	1.6	18.4

ძმარმჟავა / ნატრიუმის აცეტატი, pH = 3.6 - 5.6

CH₃COOH M.W = 60.052; 0.1მოლ = 600.52მგ / 100მლ

C₂H₃NaO₂ M.W = 82.034; 0.1მოლ = 820.34მგ / 100მლ

pH	0.1მოლ CH ₃ COOH (მლ)	0.1მოლ C ₂ H ₃ NaO ₂ (მლ)	
3.6	46.3	3.7	ივსება 100მლ -მდე
4.4	30.5	19.5	ივსება 100მლ -მდე
5.0	14.8	35.2	ივსება 100მლ -მდე

ფთალატი / HCl (0.05M), pH = 2.2 - 3.8

C₈H₅KO₄ M.W = 204.23; 0.2მოლ = 40.85გ / 1000მლ

pH (25°C)	0.2მოლ C ₈ H ₅ KO ₄ (მლ)	0.2N HCl (მლ)	
2.2	5	4.95	ზავდება 20მლ -მდე
2.4	5	4.22	ზავდება 20მლ -მდე
2.6	5	3.54	ზავდება 20მლ -მდე
2.8	5	2.89	ზავდება 20მლ -მდე
3.0	5	2.23	ზავდება 20მლ -მდე

Na_2CO_3 / NaHCO_3 , pH = 9.2 - 10.8

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ M.W = 286.2; 0.1მლ = 28.62გ / 1000მლ

NaHCO_3 M.W = 84.0; 0.1მლ = 8.4გ / 1000მლ

pH		1000მლ H_2O	
20°C	37°C	0.1მლ $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (გ)	0.1მლ NaHCO_3 (გ)
9.2	8.8	10	90
9.4	9.1	20	80
9.5	9.4	30	70
9.8	9.5	40	60
9.9	9.7	50	50
10.1	9.9	60	40
10.3	10.1	70	30
10.5	10.3	80	20
10.8	10.6	90	10

დანართი №3
ზოგიერთი ფიქსატორი

პარნუს ფიქსატორი

რეაქტივი	მოცულობა
ეთანოლი (96-100%)	60.0მლ
ქლოროფორმი	30.0მლ
ცინულოვანი ძმარმუცა	10.0მლ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 2-4სთ, 4°C ან 1-2სთ, 20°C. ამის შემდეგ მასალას ათავსებენ 100% ეთანოლში.	

ცენკურის ფიქსატორი

რეაქტივი	მოცულობა	
კალიუმის ბიქრომატი	2.5გ	მიუღერის რეაქტივი
ნატრიუმის სულფატი	1.0გ	
H ₂ O	100.0მლ	
ვერცხლისწყლის დიქლორიდი	5.0გ	
ცინულოვანი ძმარმუცა	5.0მლ	

ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 1-24სთ, 20°C. ამის შემდეგ მასალას რეც-ხავენ 12-24 საათის განმავლობაში გამდინარე წყალში. შემდგომ კი ათავსებენ 70% -იან იოდირებულ სპირტში ზედმეტი ვერცხლისწყლის დიქლორიდის მოსაშორებლად.

ბეიკერის კალციუმ-ფორმოლის ფიქსატორი

რეაქტივი	მოცულობა
40% ფორმალინი	10.0მლ
H ₂ O	90.0მლ
კალციუმის ქლორიდი	1.0გ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 24-48სთ, 20°C.	

ბუნის ფიქსატორი

რეაქტივი	მოცულობა
პიკრინის მუცას ნაჯერი ხსნარი	75.0მლ
40% ფორმალინი	25.0მლ
ცინულოვანი ძმარმუცა	5.0მლ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 1-24სთ, 20°C. პიკრინის მუცას ნაჯერი ხსნარი მზადდება წინასწარ, 3გ კრისტალიზებული მუცას 1000მლ ცხელ დისტილირებულ წყალში გახსნით. ფიქსაციის შემდგომ, კი ქსოვილი ირეცხება 70% -იან სპირტში. ცინულოვანი ძმარმუცა შესაძლოა ჩანაცვლდეს ტრიქლორძმარმუცათი.	

კლარკის ფიქსატორი

რეაქტივი	მოცულობა
ეთანოლი 100%	75.0მლ
ცინულოვანი ძმარმუცა	25.0მლ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 3-4სთ, 20°C.	

ნეიტრალური ფორმალინი ლილის მიხედვით

რეაქტივი	მოცულობა
H ₂ O	900მლ
40% ფორმალინი	100მლ
NaH ₂ PO ₄	4.0გ
Na ₂ HPO ₄	6.5გ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 24-48სთ, 20°C.	

ფორმალინ - ფიზ.სსნარი (Formal-Saline)

რეაქტივი	მოცულობა
40% ფორმალინი	100მლ
H ₂ O	900მლ
NaCl	9.0გ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 12-24სთ, 20°C.	

სპირტიანი ფორმალინი

რეაქტივი	მოცულობა
ეთანოლი 95%	900მლ
40% ფორმალინი	100მლ
კალციუმის აცეტატი	0.5გ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 12-24სთ, 20°C.	

ჰელის ფიქსატორი

რეაქტივი	მოცულობა
H ₂ O	1000მლ
40% ფორმალინი	50.0მლ
K ₂ Cr ₂ O ₇	25.0გ
Na ₂ SO ₄	10.0გ
HgCl ₂	50.0გ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 4-24სთ, 20°C. ფორმალინი ემატება უშუალოდ გამოყენების წინ!	

ჰოლანდის ფიქსატორი

რეაქტივი	მოცულობა
H ₂ O	1000მლ
40% ფორმალინი	100.0მლ
Cu(CH ₃ COO) ₂	25.0გ
პიკრინის მუავა	40.0გ
ძმარმუავა	15.0მლ
ფიქსაციის ხანგრძლივობაა 4-18სთ, 20°C.	

დანართი №4
ამონიუმის სულფატით გაჯერების ცხრილი

ამონიუმის სულფატიტ გაჯერების ცხრილი (+20°C)

		სასურველი (საბოლოო) გაჯერება (%)																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
საწყისი გაჯერება (%)	ერთ ლიტრ ხსნარზე დასამატებელი ამონიუმის სულფატის წონა (გრამი)																		
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761		
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723		
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685		
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647		
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609		
25	0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571			
30	0	0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533			
35	0	0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495				
40	0	0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457					
45	0	0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419						
50	0	0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381							
55	0	0	33	66	101	138	175	215	256	298	343								
60	0	0	33	67	103	140	179	219	261	305									
65	0	0	34	69	105	143	183	224	267										
70	0	0	34	70	107	146	186	228											
75	0	0	35	72	110	149	190												
80	0	0	36	73	112	152													
85	0	0	37	75	114														
90	0	0	37	76															
95	0	0	38																

გამოყენებული ლიტერატურა

1. ალექსიძე ნ. (2008). *ბიოქიმია მედიკოსებისათვის*. გამომცემლობა უნივერსალი
2. კოშორიძე ნ. (2018). *ფუნქციური ბიოქიმია (მეორე გამოცემა)*. ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის გამომცემლობა
3. ნანეიშვილი გ. (2001). *ფსიქიატრიის მოკლე კურსი (მეორე გამოცემა)*. მეცნიერება
4. ქომეთიანი ზ. (2008). *მეზერანოლოგია*. ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის გამომცემლობა
- 5.
6. Ahmari, S. E., & Dougherty, D. D. (2015). Dissecting Ocd Circuits: From Animal Models To Targeted Treatments. *Depression and anxiety*, 32(8), 550–562. <https://doi.org/10.1002/da.22367>
7. Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics*. 2011 May;10(5):R110.006924. doi: 10.1074/mcp.M110.006924.
8. Alonso, P., et al. (2015). Animal models of obsessive-compulsive disorder: utility and limitations. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 1939–1955. <https://doi.org/10.2147/NDT.S62785>
9. Bancroft J.D. (1975). *Histochemical Techniques (Second Edition)*. Butterworth-Heinemann
10. Becker H. C. (2000). Animal models of alcohol withdrawal. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 24(2), 105–113.
11. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, Wilson RS. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*. 2006 Jun 27;66(12):1837–44. doi: 10.1212/01.wnl.0000219668.47116.e6.
12. Beyer, D. K. E., & Freund, N. (2017). Animal models for bipolar disorder: from bedside to the cage. *International journal of bipolar disorders*, 5(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40345-017-0104-6>
13. Bialon, Magdalena, and Agnieszka Wasik. (2022). "Advantages and Limitations of Animal Schizophrenia Models" *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 11: 5968. <https://doi.org/10.3390/ijms23115968>
14. Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014 Apr;71(4):505–8. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5847.
15. Camilla d'Angelo, L. S., et al. (2014). Animal models of obsessive-compulsive spectrum disorders. *CNS spectrums*, 19(1), 28–49. <https://doi.org/10.1017/S1092852913000564>
16. Can A, Blackwell RA, Piantadosi SC, Dao DT, O'Donnell KC, Gould TD. (2011). Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. *Genes Brain Behav*. 10(4):434–443.
17. Can A, Dao DT, et al. (2012). The mouse forced swim test. *J Vis Exp*. (59):e3638. doi:10.3791/3638
18. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. (2012) The tail suspension test. *J Vis Exp*. (59)
19. Carter M., Shieh J.C. (2010). *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01891-1>
20. Chadman, K. K., Fernandes, S., DiLiberto, E., & Feingold, R. (2019). Do animal models hold value in Autism spectrum disorder (ASD) drug discovery?. *Expert opinion on drug discovery*, 14(8), 727–734. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1621285>
21. Chakraborty P, Ibáñez de Opakua A, Purslow JA, Fromm SA, Chatterjee D, Zachrdla M, Zhuang S, Puri S, Woloizin B, Zweckstetter M. GSK3 β phosphorylation catalyzes the aggregation of tau into Alzheimer's disease-like filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024 Dec 24;121(52):e2414176121. doi: 10.1073/pnas.2414176121.
22. Chamberlain, B. L., & Ahmari, S. E. (2021). Animal Models for OCD Research. *Current topics in behavioral neurosciences*, 49, 55–96. https://doi.org/10.1007/7854_2020_196
23. Chao, O. Y., Pum, M. E., Li, J. S., & Huston, J. P. (2012). The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6-hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle. *Neuroscience*, 202, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.016>

24. Chen, X., Andrews, P. C., & Wang, Y. (2012). Quantitative analysis of liver Golgi proteome in the cell cycle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 909, 125–140. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-959-4_9
25. Chen, Z. Y., & Zhang, Y. (2022). Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives. *Zoological research*, 43(6), 1026–1040. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.289>
26. Chia, S. J., Tan, E. K., & Chao, Y. X. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2464. <https://doi.org/10.3390/ijms21072464>
27. Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., & Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 64, 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>
28. Das, G., Reuhl, K., & Zhou, R. (2013). The Golgi-Cox method. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1018, 313–321. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-444-9_29
29. Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
30. de Araújo, H. H., Soares, G. D. D., Mendes, J. D., Anselmo-Moreira, F., da Costa, B. R. B., Nascimento, A., Meireles, C. S., Catharino, E. L. M., Rodrigues, P. M. F., Rocco, M., Staudt, M., Furlan, C. M., de Souza, S. R., Fornaro, A., Borbon, A., & da Silva, L. C. (2025). Atmospheric pollution affects the morphoanatomical and physiological responses of plants in urban Atlantic Forest remnants. *Environmental science and pollution research international*, 10.1007/s11356-025-35952-0. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s11356-025-35952-0>
31. De Robertis, E., Pellegrino De Iraldi, A., Rodriguez De Lores Garnaiz, G., & Salganicoff, L. (1962). Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and acetylcholinesterase. *Journal of neurochemistry*, 9, 23–35. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1962.tb07489.x>
32. de Sousa, A., et al. (2017). Metalaxyl Effects on Antioxidant Defenses in Leaves and Roots of *Solanum nigrum* L. *Frontiers in plant science*, 8, 1967. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01967>
33. Deacon R. M. (2013). Measuring the strength of mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (76), 2610. <https://doi.org/10.3791/2610>
34. Deacon, R. M. J. (2013). Measuring the Strength of Mice. *J. Vis. Exp.* (76), e2610, doi:10.3791/2610
35. Deitch, A. D. and Moses, M. J. (1957). The nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(23): 449–456.
36. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):461–91. doi: 10.3233/JPD-130230.
37. Dreij K., and Karlsson H. (2016). *Applications of Methods in Toxicology*. Karolinska Institute
38. Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133(2), 155–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
39. Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., & Villegas, S. (2017). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 57(4), 1171–1183. <https://doi.org/10.3233/JAD-170045>
40. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*. 1991 Oct;114 (Pt 5):2283–301. doi: 10.1093/brain/114.5.2283.
41. Fernandes RM, Corrêa MG, Aragão WAB, Nascimento PC, Cartágenes SC, Rodrigues CA, Sarmiento LF, Monteiro MC, Maia CDSF, Crespo-López ME, Lima RR. Preclinical evidences of aluminum-induced neurotoxicity in hippocampus and pre-frontal cortex of rats exposed to low doses. *Ecotoxicol*
42. Fernando, A. B., & Robbins, T. W. (2011). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Annual review of clinical psychology*, 7, 39–61. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032210-104454>
43. Freund, N., & Juckel, G. (2019). Bipolar Disorder: Its Etiology and How to Model in Rodents. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2011, 61–77. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9554-7_4
44. Galla, L.; Redolfi, N.; Pozzan, T.; Pizzo, P.; Greotti, E. Intracellular Calcium Dysregulation by the Alzheimer's Disease-Linked Protein Presenilin 2. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 770. <https://doi.org/10.3390/ijms21030770>

45. García-García, Ó. D., Weiss, T., Chato-Astrain, J., Raimondo, S., & Carriel, V. (2023). Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2566, 187–203. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2675-7_15
46. Ghafarimoghadam M., et al. (2022). A review of behavioral methods for the evaluation of cognitive performance in animal models: Current techniques and links to human cognition. *Physiology & behavior*, 244, 113652. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113652>
47. Goltseker, K., Hopf, F. W., & Barak, S. (2019). *Advances in behavioral animal models of alcohol use disorder. Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 74, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.05.014>
48. González-Cabrera C. (2024). *Rotarod-Test for Mice*. [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.14egn3qpm15d/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.14egn3qpm15d/v1)
49. Goodman, W. K., Grice, D. E., Lapidus, K. A., & Coffey, B. J. (2014). Obsessive-compulsive disorder. *The Psychiatric clinics of North America*, 37(3), 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2014.06.004>
50. Hao, Y., Ge, H., Sun, M., & Gao, Y. (2019). Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4827. <https://doi.org/10.3390/ijms20194827>
51. Harisba S. (2007). *Biotechnology Procedures And Experiments Handbook*. Infinity Science Press LLC
52. Harper C., and Lawrence Ch. (2011). *The Laboratory Zebrafish*. Taylor and Francis Group
53. Harro J. (2019). Animal models of depression: pros and cons. *Cell and tissue research*, 377(1), 5–20. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2973-0>
54. Hu S, Hu M, Liu J, Zhang B, Zhang Z, Zhou FH, Wang L, Dong J. Phosphorylation of Tau and α -Synuclein Induced Neurodegeneration in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020 Mar 4;16:651-663. doi: 10.2147/NDT.S235562.
55. Humason, G. L. (1983). *Animal Tissue Techniques*, San Francisco, W. H. Freeman and Company.
56. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2010 Dec;7(8):656-64. doi: 10.2174/156720510793611592.
57. Jagust W. Is amyloid- β harmful to the brain? Insights from human imaging studies. *Brain*. 2016 Jan;139(Pt 1):23-30. doi: 10.1093/brain/awv326.
58. Jagust W. Is amyloid- β harmful to the brain? Insights from human imaging studies. *Brain*. 2016 Jan;139(Pt 1):23-30. doi: 10.1093/brain/awv326.
59. Jones, C. A., et al. (2011). Animal models of schizophrenia. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1162–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>
60. Kawahara M, Kato-Negishi M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis*. 2011 Mar 8;2011:276393. doi: 10.4061/2011/276393.
61. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*. 2006 May 10;26(19):5256-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0984-06.2006.
62. Keith W., and John W. (2005). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (Sixth edition)*. Cambridge University Press
63. Kessi, M., et al. (2022). Attention-deficit/hyperactive disorder updates. *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 925049. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.925049>
64. Kiernan J. (2015). *Histological and Histochemical Methods (Fifth Edition)*. Scion Publishing The Limited
65. Kimberly Chapman, Parith Wongkittichote. (2020). *Isocitrate dehydrogenase*. [protocols.io https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bfisjkee](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bfisjkee)
66. Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. (2019). Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5402. <https://doi.org/10.3390/ijms20215402>
67. Koga S, Sekiya H, Kondru N, Ross OA, Dickson DW. Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies. *Mol Neurodegener*. 2021 Dec 18;16(1):83. doi: 10.1186/s13024-021-00501-z.
68. Komada, M., Takao, K., & Miyakawa, T. (2008). Elevated plus maze for mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (22), 1088. <https://doi.org/10.3791/1088>

69. Komersová, A., Komers, K., & Cegan, A. (2007). New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 62(1-2), 150–154. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-1-225>
70. Kosel, F., Pelley, J. M. S., & Franklin, T. B. (2020). Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 112, 634–647. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.02.012>
71. Laura García-Descalzo, et al. (2012). *Gel Electrophoresis of Proteins, Gel Electrophoresis – Principles and Basics*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech. <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/gel-electrophoresis-of-proteins>
72. Lee, G., & Zhou, Y. (2019). NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 185. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00185>
73. Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Adlard PA, Masters CL, Bush AI. Tau protein: relevance to Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Nov;42(11):1775–8. doi: 10.1016/j.biocel.2010.07.016.
74. Mack, A. A., Gao, Y., Ratajczak, M. Z., Kakar, S., & El-Mallakh, R. S. (2019). Review of animal models of bipolar disorder that alter ion regulation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 107, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.016>
75. Malik, J. A., et al. (2023). Understanding translational research in schizophrenia: A novel insight into animal models. *Molecular biology reports*, 50(4), 3767–3785. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08241-7>
76. Mann A., and Chesselet M.F. (2015). *Movement Disorders (Second Edition)*. Academic Press
77. Martin H. (2006). *Basic Methods for the Biochemical Lab (First English Edition)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
78. Méndez, J., & Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Molecular and cellular biology*, 20(22), 8602–8612. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.22.8602-8612.2000>
79. Montgomery, H. A. C and Dymock, J. F. (1961). *Analyst*, 86, 414
80. Morris, H. R., Spillantini, M. G., Sue, C. M., & Williams-Gray, C. H. (2024). The pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 403(10423), 293–304. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01478-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01478-2)
81. Moussaud, S., Jones, D.R., Moussaud-Lamodière, E.L. et al. Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration?. *Mol Neurodegeneration* 9, 43 (2014). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-43012>.
82. Nelson O, Supnet C, Liu H, Bezprozvanny I. Familial Alzheimer's disease mutations in presenilins: effects on endoplasmic reticulum calcium homeostasis and correlation with clinical phenotypes. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(3):781-93. doi: 10.3233/JAD-2010-100159.
83. Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience*, 13(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>
84. Nikoloz Zhgenti et al. (2023). Exploring the Neuroprotective Effects of Nicotine Against MPTP-Induced Neuronal Damage in Mice: Insights into Antioxidant System. *International Journal of Biochemistry and Biophysics*, 11(3), 27 – 34. DOI: 10.13189/ijbb.2023.110301.
85. Nunez J. (2008). Morris Water Maze Experiment. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (19), 897. <https://doi.org/10.3791/897>
86. Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 70(1), 158–169.
87. Parlakgöl, G., et al. (2022). Regulation of liver subcellular architecture controls metabolic homeostasis. *Nature*, 603(7902), 736–742. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04488-5>
88. Pellegrini, L., et al. (2020). Human CNS barrier-forming organoids with cerebrospinal fluid production. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6500), eaaz5626. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5626>
89. Peñagarikano O. (2017). Oxytocin in animal models of autism spectrum disorder. *Developmental neurobiology*, 77(2), 202–213. <https://doi.org/10.1002/dneu.22449>
90. Petty, A., Howes, O., & Eyles, D. (2021). Animal Models of Relevance to the Schizophrenia Prodrome. *Biological psychiatry global open science*, 3(1), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.bpsgos.2021.12.001>

91. Pizzo P, Basso E, Filadi R, Greotti E, Leparulo A, Pendin D, Redolfi N, Rossini M, Vajente N, Pozzan T, Fasolato C. Presenilin-2 and Calcium Handling: Molecules, Organelles, Cells and Brain Networks. *Cells*. 2020 Sep 25;9(10):2166. doi: 10.3390/cells9102166.
92. Planchez, B., Surget, A., & Belzung, C. (2019). Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *Journal of neural transmission*, 126(11), 1383–1408. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y>
93. Prut, L., and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272)
94. Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2015 Jul;10(7):703–11. doi: 10.1517/17460441.2015.1041913.
95. Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., & Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 10(7), 703–711. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1041913>
96. Qiu, W., Hodges, T. E., Clark, E. L., Blankers, S. A., & Galea, L. A. M. (2020). Perinatal depression: Heterogeneity of disease and in animal models. *Frontiers in neuroendocrinology*, 59, 100854. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2020.100854>
97. Rahi, V., & Kumar, P. (2021). Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 81(2), 107–124. <https://doi.org/10.1002/jdn.10089>
98. Regan, S. L., Williams, M. T., & Vorhees, C. V. (2022). Review of rodent models of attention deficit hyperactivity disorder. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 132, 621–637. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.11.041>
99. Rodney B. (2012). *Biochemistry Laboratory: Modern Theory And Techniques (Second Edition)*. Pearson Education
100. Rooze, M. A., & Hinsenkamp, M. G. (1982). Histochemical modifications induced "in vitro" by electromagnetic stimulation of growing bone tissues. *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum*, 196, 51–62. <https://doi.org/10.3109/17453678209158549>
101. Russell V. A. (2011). Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Current protocols in neuroscience, Chapter 9, Unit9.35*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0935s54>
102. Satav, J. G., Dave, K. R., & Katyare, S. S. (2000). Influence of insulin status on extra-mitochondrial oxygen metabolism in the rat. *Hormone and metabolic research*, 32(2), 57–61. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978589>
103. Scharner, S., & Stengel, A. (2021). Animal Models for Anorexia Nervosa-A Systematic Review. *Frontiers in human neuroscience*, 14, 596381. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.596381>
104. Schulz, M., Ziegłowski, L., Kopaczka, M., & Tolba, R. H. (2023). The Open Field Test as a Tool for Behaviour Analysis in Pigs: Recommendations for Set-Up Standardization - A Systematic Review. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, 64(1), 7–26. <https://doi.org/10.1159/000525680>
105. Scott D, Roy S. α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *J Neurosci*. 2012 Jul 25;32(30):10129–35. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0535-12.2
106. Semple, David, and Roger Smyth, *Oxford Handbook of Psychiatry*, 4 edn, Oxford Medical Handbooks (Oxford, 2019; online edn, Oxford Academic, 1 June 2019), <https://doi.org/10.1093/med/9780198795551.001.0001>, accessed 2 Nov. 2024.
107. Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. (1987) *Theory And Practice Of Histotechnology (Second Edition)*. Battelle Memorial Institute.
108. Shen, C. and Chen, Y. (2013). Preparation of Pre- and Post-synaptic Density Fraction from Mouse Cortex. *Bio-protocol* 3(17): e880. DOI: 10.21769/BioProtoc.880.
109. Song, J., & Kim, Y. K. (2021). Animal models for the study of depressive disorder. *CNS neuroscience & therapeutics*, 27(6), 633–642. <https://doi.org/10.1111/cns.13622>
110. Song, Y., et al. (2006). Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics*, 6(19), 5269–5277. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500893>

111. Sontag, T. A., Tucha, O., Walitza, S., & Lange, K. W. (2010). Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a critical review. *Attention deficit and hyperactivity disorders*, 2(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s12402-010-0019-x>
112. Sovrea, A. S., & Bosca, A. B. (2013). Astrocytes reassessment – an evolving concept part one: embryology, biology, morphology and reactivity. *Journal of molecular psychiatry*, 1(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-18>
113. Stancu IC, Vasconcelos B, Terwel D, Dewachter I. Models of β -amyloid induced Tau-pathology: the long and "folded" road to understand the mechanism. *Mol Neurodegener*. 2014 Nov 18;9:51. doi: 10.1186/1750-1326-9-51.
114. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 85(3):367–70.
115. Suckow M.A., et al. (2019). *The Laboratory Rat*. Taylor and Francis Group
116. Suckow M.A., et al. (2023) *The Laboratory Mouse (3rd Edition)*. Taylor and Francis Group
117. Szechtman, H., et al. (2017). Obsessive-compulsive disorder: Insights from animal models. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 76(Pt B), 254–279. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.019>
118. Tabakoff, B., & Hoffman, P. L. (2000). Animal models in alcohol research. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 24(2), 77–84.
119. Tao Y., et al. (2013).
120. Tran, T. M., Dai, T. X. T., Tran, D. B., Nguyen, Q. C. T., & Nguyen, D. H. Y. (2019). A simple spectrophotometric method for quantifying total lipids in plants and animals. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, 11(2), 106–110. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2019.030>
121. Uliana, D. L., et al. (2022). Using animal models for the studies of schizophrenia and depression: The value of translational models for treatment and prevention. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16, 935320. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.935320>
122. Van Dyke N, Yenugadhati N, Birkett NJ, Lindsay J, Turner MC, Willhite CC, Krewski D. Association between aluminum in drinking water and incident Alzheimer's disease in the Canadian Study of Health and Aging cohort. *Neurotoxicology*. 2021 Mar;83:157–165. doi: 10.1016/j.neuro.2020.04.002. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32360354.
123. Varghese, M., et al. (2017). Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta neuropathologica*, 134(4), 537–566. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4>
124. Vázquez, J. C., et al. (2022). Effects of Caffeine Consumption on Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) Treatment: A Systematic Review of Animal Studies. *Nutrients*, 14(4), 739. <https://doi.org/10.3390/nu14040739>
125. Vila M. (2019). Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 34(10), 1440–1451. <https://doi.org/10.1002/mds.27776>
126. Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*, 1(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
127. Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychological bulletin*, 83(3), 482–504.
128. Wang Z, Wei X, Yang J, Suo J, Chen J, Liu X, Zhao X. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2016 Jan 1;610:200–6. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.014.
129. Wang, P., Li, M., Zhao, A., & Ma, J. (2021). Application of animal experimental models in the research of schizophrenia. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 186(4), 209–227. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32863>
130. Wilson DM 3rd, Cookson MR, Van Den Bosch L, Zetterberg H, Holtzman DM, Dewachter I. Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*. 2023 Feb 16;186(4):693–714. doi: 10.1016/j.cell.2022.12.032
131. Winship, I. R., et al. (2019). An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie*, 64(1), 5–17. <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>

132. Yan, H. C., Cao, X., Das, M., Zhu, X. H., & Gao, T. M. (2010). Behavioral animal models of depression. *Neuroscience bulletin*, 26(4), 327–337. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-0323-7>
133. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. (2015). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp.* (97):52587. doi:10.3791/52587
134. Zamberletti, E., et al. (2019). Cannabidiol Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 367. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00367>
135. Zhang F, Gannon M, Chen Y, Yan S, Zhang S, Feng W, Tao J, Sha B, Liu Z, Saito T, Saido T, Keene CD, Jiao K, Roberson ED, Xu H, Wang Q. β -amyloid redirects norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3 β /tau cascade. *Sci Transl Med.* 2020 Jan 15;12(526):eaay6931. doi: 10.1126/scitranslmed.aay6931.
136. Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr.* 2011 Jul-Aug;5(4):280–92. doi: 10.4161/cam.5.4.16986.
137. Альбертсон П.О. (1974). *Разделение Клеточных Частиц и Макромолекул*. Издательство Мир
138. Асатиани В.С. (1953). *Биохимический Анализ*. Грузмедгиз
139. Граник В.Г. (2001). *Основы Медицинской химии*. Вузовская книга
140. Данченко Е.О. и др. (2018). *Методы Биохимических Исследований, Основанные На Применении Специализированного Оборудования*. ВГУ имени П.М. Машерова
141. Добрынина В.И., Свешникова Е.Я. (1967). *Руководство К Практическим Занятиям По Биологической Химии (Издание Второе)*. Издательство “Медицина”
142. Збарский Б.И. и др. (1954). *Практикум По Биологической Химии*. Медгиз
143. Пирс Э. (1962). *Гистохимия*. Издательство Иностранной Литературы
144. Северин С.Е., Соловьева Г.А. (1989). *Практикум По Биохимии (Второе Издание)*. Издательство Московского Университета
145. Софонова О.А., Макеева А.В., Попова Т.Н. (2011). *Большой Практикум По Биохимии*. Издательско-Полиграфический Центр Воронежского Государственного Университета
146. Уильямс Б., Уилсон К. (1978). *Методы Практической Биохимии*. Издательство Мир
147. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000100003>
148. http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html
149. <https://histologistics.com/human-kidney-methyl-violet-amyloid-10x/>
150. <https://www.ljari.tech/systems>
151. https://www.neurosciencecourses.com/uploads/3/4/4/9/34494139/_cresyl_violet_stain_neurosciencecourses.pdf
152. <https://www.polysciences.com/default/cresyl-violet-acetate-certified>
153. <https://www.amuzainc.com/blog/how-to-set-up-an-open-field-test-for-animal-behavior-research/>
154. <https://www.youtube.com/watch?v=v56MtrmWAs0>
155. <https://www.neurofit.com/tech-anim-beam-walking.html>
156. <https://www.e-phy-science.com/elevated-plus-maze/?sfw=pass1739302672>
157. <https://histogene.co/passive-avoidance-task-shuttle-box/>
158. <https://www.harvardapparatus.com/tail-suspension-test.html>

შეფასებები და რეკომენდაციები

რედაქტორის შეფასება

ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის სახელმძღვანელოს შესახებ: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“

ავტორთა ჯგუფმა (ნ. ჟღენტი, ო.ბიბილაშვილი) შემომთავაზა მათ მიერ შექმნილი მეთოდური სახელმძღვანელოს “ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები” რედაქტორობა. სახელმძღვანელო ეძღვნება ნეიროფსიქიატრიის, როგორც მეცნიერების, მოლეკულური საფუძვლების კვლევის მეთოდების დეტალურ ანალიზს. როგორც ყველასთვის ცნობილია, ბიო-სამედიცინო მეცნიერებები და მათ შორის განსაკუთრებით ფსიქიატრია მჭიდრო კავშირშია ბიოქიმიურ და ნეიროქიმიურ კვლევებთან, რომელიც იძლევა იმის საფუძველს, რათა დეტალურად იყოს შესწავლილი ფსიქიური დაავადებების მოლეკულური მექანიზმები და მათი გამომწვევი მიზეზები. ავტორების მიერ დეტალურადაა განხილული დღესდღეობით ცნობილი ფსიქიური დაავადებების თეორიული საფუძვლები, ამავე დროს სახელმძღვანელოში დიდი მოცულობითაა წარმოდგენილი ამ დაავადებების შესწავლისათვის აუცილებელი ბიოქიმიური მეთოდები. ამ მეთოდებს შორის განსაკუთრებით დიდი ყურადღება ექცევა თავის ტვინში მოქმედი მნიშვნელოვანი ფერმენტული სისტემების კვლევის მეთოდოლოგიას. ფერმენტების შესწავლის გარდა თანამედროვე ბიოქიმიური კვლევები წარმოუდგენელია ისეთი მეთოდების გარეშე, როგორიცაა ვესტერ-ბლოტინგი, ქრომატოგრაფიული მეთოდები, უჯრედული სტრუქტურების განცალკევებისა და გამოყოფის ცენტრიფუგირების მეთოდები და სხვა, რაც იძლევა იმის გარანტიას, რომ აღნიშნული სახელმძღვანელო იქნება საჭირო და გამოსადეგი არა მარტო სამეცნიერო კვლევებში ჩართული ექიმი ფსიქიატრებისათვის, არამედ ბიოქიმიკოსებისთვისაც, რომლების აქტიურად მონაწილეობენ ექსპერიმენტულ მუშაობაში. ბიოქიმიური კვლევითი მეთოდების გარდა სახელმძღვანელოს დადებით მხარედ მიმაჩნია ის მრავალრიცხოვანი ფიზიოლოგიური ქცევითი ტესტების დეტალური განხილვა, რომელიც ამ ტიპის სამეცნიერო კვლევების განუყოფელი ნაწილია.

სახელმძღვანელოს შედგენის პროცესში ავტორების მიერ გამოყენებულია თანამედროვე ქართულენოვანი, თუ უცხოური ლიტერატურა, მათ შორის მაღალრეიტინგულ ჟურნალებში გამოქვეყნებული სტატიები, რაც მას ღირებულსა და მნიშვნელოვანს ხდის. ყოველივე ზემოთქმულის გათვალისწინებით, როგორც მეცნიერს და წიგნის რედაქტორს, მიმაჩნია, რომ აღნიშნული სახელმძღვანელო აუცილებელია გამოიცეს, ვინაიდან იგი დიდ დახმარებას გაუწევს არა მხოლოდ მედიკოს-ფსიქიატრებს, არამედ მომიჯნავე სპეციალობის წარმომადგენლებსაც, ვინაიდან გარდა თეორიული ცოდნისა, იგი კვლევითი მუშაობისათვის აუცილებელი პრაქტიკული უნარჩვევების გამომუშავებასაც შეუწყობს ხელს.

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
თსუ -ს ბიოქიმიის კათედრის გამგე,
პროფესორი ნ. კოშორიძე



რეცენზია

ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის სახელმძღვანელოს შესახებ: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“

სახელმძღვანელო “ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები” შესრულებულია ახალგაზრდა მკვლევრების: ნიკოლოზ ჟღენტის და ოთარ ბიბილაშვილის მიერ. იგი აგებულია ტრადიციული ფორმით და ეყრდნობა 150-ზე მეტ ლიტერატურულ წყაროს, რომელთა შორისაა ფუნდამენტური და თანამედროვე პუბლიკაციები.

მოლეკულური ფსიქიატრია, ზოგადად, აკავშირებს რა ფსიქიატრიასა და მოლეკულურ ბიოლოგიას, გვთავაზობს ცოდნას ფსიქიკური აშლილობების საფუძველში არსებული ბიოლოგიური მექანიზმების შესახებ. ამ სფეროში კვლევის მეთოდების გააზრება აუცილებელია ფსიქიატრიული მკურნალობის წინსვლისთვის. ამავე დროს, მნიშვნელოვანია მისი ინტერდისციპლინური გავლენა, რადგან მოლეკულური ფსიქიატრია აკავშირებს ისეთ სფეროებს, როგორიცაა ნეირომეცნიერება, გენეტიკა და ფარმაკოლოგია, რაც უზრუნველყოფს ფსიქიკური ჯანმრთელობის კვლევის ჰოლისტურ ხედვას.

სახელმძღვანელოს შეფასებისას ყურადღება მივაქციეთ მის შინაარსობრივ სტრუქტურას. ამ თვალსაზრისით ყურადსაღებია, რომ იგი მოიცავს მოლეკულურ ფსიქიატრიაში გამოყენებული, ტრანსლაციური მედიცინის პრინციპებზე დაფუძნებული მეთოდების ფართო სპექტრს, მათ შორის, ლაბორატორიული ცხოველების მოვლას, ბიოქიმიურ და ჰისტოქიმიურ მეთოდებს, რაც კვლევებში საფუძვლიან და სიღრმისეულ ანალიზს უზრუნველყოფს. ეს მეთოდები მრავალფეროვანია - აღწერილია 200-ზე მეტი მეთოდი, რაც უნიკალური რესურსია საქართველოს რეალობისთვის, სადაც მსგავსი სახელმძღვანელოები დეფიციტურია. ამავე დროს, ზედმიწევნითაა დახასიათებული კვლევის მოდელირების მეთოდები, რაც ამარტივებს რთული ექსპერიმენტების დაგეგმვას.

სახელმძღვანელოს შეფასებისას აღსანიშნავია, რომ ავტორები იყენებენ ზუსტ ტექნიკურ ტერმინებსა და განმარტებებს, რაც აუცილებელია პროფესიული სამეცნიერო ლიტერატურისთვის. ნაშრომი ქმნის სტრუქტურირებულ წარმოდგენას, რადგან ტექსტი კარგადაა ორგანიზებული, დაწყებული შესავალი ნაწილებით, რაც მკითხველს ეხმარება მარტივად გაეცნოს თემას.

სახელმძღვანელოს ავტორების სამიზნე აუდიტორიას წარმოადგენენ სტუდენტები, მაგისტრანტები და დოქტორანტები, განსაკუთრებით ბიოლოგიისა და მედიცინის მიმართულებით. წიგნი შეიძლება ასევე მნიშვნელოვანი გახდეს პროფესიონალებისთვისაც, განსაკუთრებით ფსიქიატრიის/ნეირომეცნიერების სფეროში და ლაბორატორიებისთვის, რომლებიც ფსიქიატრიული აშლილობების კვლევას აწარმოებენ.

განსაკუთრებით უნდა აღინიშნოს, რომ სახელმძღვანელო “ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები” საუკეთესო ქართულენოვანი რესურსია და ქართულ ენაზე მსგავსი სახელმძღვანელოების ნაკლებობა, ამ წიგნს განსაკუთრებულ მნიშვნელობას ანიჭებს.

წიგნის მიმართ არსებითი შენიშვნები არ მაქვს, თუმცა ტექსტში გაპარულია მარტივი ორთოგრაფიული შეცდომები და ასევე ვისურვებდი, რომ იგი ხელმისაწვდომი ყოფილიყო ციფრულ ფორმატში, მაგალითად, ელექტრონული ვერსია (ან ინტერაქტიული პლატფორმა), რაც

მნიშვნელოვან გაზრდის მის აუდიტორიას. ასევე ვთვლი, რომ მომავალში, წიგნის შინაარსს გაამდიდრებდა პრაქტიკული მაგალითები და რეალური კვლევის ქეისების განხილვა.

დასასრულს, მსურს აღვნიშნო, რომ სახელმძღვანელო “ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია” (ავტორები: ნიკოლოზ ჟღენტი, ოთარ ბიბილაშვილი) მაღალი პროფესიული ღირებულების მქონე რესურსია, რომელიც შეესაბამება როგორც სტუდენტურ, ისე პროფესიულ მოთხოვნებს. მისი დეტალური და სიღრმისეული შესწავლა დიდ მხარდაჭერას გაუწევს მოლეკულური ფსიქიატრიის კვლევებს საქართველოში.

მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი,
თსუ-ს ფსიქიატრიისა და სამედიცინო ფსიქოლოგიის კათედრის გამგე,
პროფესორი ნინო ოკრიბელაშვილი

ნ. ოკრიბელაშვილი

რეცენზია

ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის სახელმძღვანელოს შესახებ: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“

ფართოდ ცნობილია, რომ კვლევითი მოდელები წარმოადგენს ერთ-ერთ ძირითად კვლევა-ძიების საშუალებას მედიცინაში. საგულისხმოა, რომ ცხოველური მოდელები გამოიყენება დაავადების მოდელირებისათვის, რაც თავის მხრივ უკვე უნივერსალური მასალაა ცალკეული დარღვევის ან სინდრომის პათოფიზიოლოგიური ან პათომორფოლოგიური საწყისების გამოძიებაში. შეუფასებელია ამ მეთოდის გამოყენება ექსპერიმენტალურ ფარმაცოლოგიაში. ასევე, უდავოა მისი როლი ახალგაზრდა მკვლევარების გამოცდილებისა და წვრთნის გზაზე. სავარაუდოდ, ეს ასპექტი გახდა საწყის არგუმენტად თუ რატომ შეეხნენ თსუ მედიცინის ფაკულტეტის სტუდენტები ამ უმნიშვნელოვანეს და აქტუალურ პრობლემატიკას.

ავტორების სასარგებლოდ უნდა ითქვას, რომ მათ ნეირომეცნიერებისა და მენტალური ჯანმრთელობის გადაკვეთის საინტერესო ასპექტები ამოარჩიეს და ენციკლოპედიურ სტილში გააშუქეს არსებული ცხოველური კვლევის მოდელები. გაწეულია დიდი და ინტენსიური შრომა, ასევე მოკლედ არის მოტანილი უახლესი წარმოდგენები გარკვეულ ნევროლოგიური და მენტალური დარღვევების პათოფიზიოლოგიურ მექანიზმებზე. ნეირომეცნიერების ეს ასპექტები წარმოადგენს მედიცინის დიდ გამოწვევას, რაც ახალგაზრდა მეცნიერებმა წარმატებით გადალახეს. წიგნი დაწერილია კარგი ქართულით, მოცემულია საერთაშორისო აბრევიატურაც და გამოყენებული ლიტერატურის სიაც. ნაშრომი უდავოდ ხელს შეუწყობს ნებისმიერ მკვლევართა ჯგუფს სწორად დაგეგმონ და წარმართონ კვლევები. მოცემულ ასპექტებზე იშვიათია სამეცნიერო ლიტერატურა ქართულ ენაზე. ამიტომაც, ზემოაღნიშნული წიგნი იქნება ღირებული და საჭირო შენაძენი ყველა მეცნიერის ბიბლიოთეკისთვის.

იმ ნეიროფსიქიატრიის ქვეთავებში, რომელიც ჩემი რეცენზიის ყურადღების ქვეშ აღმოჩნდა, იყო ბუნდოვანი მომენტები, რომელიც რეცენზენტორისაგან მიღებული მითითებების შემდეგ, ფუნდამენტალურად გადაკეთდა და გამდიდრდა პირველწყაროებით. სახელმძღვანელოს სათაური ასევე იწვევს გარკვეულ კითხვებს: წიგნში განხილულია მენტალური დარღვევები, რომელიც არ მიეკუთვნება ნეიროფსიქიატრიის სფეროს და საპირისპიროდ, ყველა ტრადიციული ნეიროფსიქიატრიული პათოლოგიები არ არის მოცემული სახელმძღვანელოში.

მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი

თსუ მედიცინის ფაკულტეტის ნევროლოგიის კათედრის ასოცირებული პროფესორი,
დავით გიგინეიშვილი

რ. გიგინეიშვილი

რეცენზია

ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის სახელმძღვანელოს შესახებ: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“

საყოველთაოდ ცნობილია, რომ მედიკო-ბიოლოგიური პროფილის მრავალრიცხოვან დარგში მნიშვნელოვანი პროგრესის მიღწევის მიუხედავად, კვლავ რჩება ძველიც და ჩნდება ახალი პრობლემებიც. ერთ-ერთ ასეთ დაავადებად დღემდე რჩება ფსიქიკური აშლილობებით მიმდინარე ნოზოლოგიები, რომელთა ეტიო-პათოგენეზში წვდომა დღემდე ბოლომდე მიუღწეველია. ამ ფაქტის გააზრებით ფრიად საინტერესოა ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის მედიცინის ფაკულტეტის სტუდენტების: ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის მიერ სახელმძღვანელოს შექმნა სათაურით: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“.

ავტორთა მიერ წარმოდგენილი ნაშრომი ორიგინალურია და დიდ ინტერესს იწვევს მკითხველში იმ ფაქტის გამო, რომ მიღებული დასკვნები ეფუძნება მრავალრიცხოვანი მეთოდური მიდგომების გამოყენებით მიღწეული ფსიქიკური აშლილობის ზომომოდელირებით (თეთრი ვირთაგვები, თეთრი თაგვები, ზებრა თევზი და სხვა) მიღებული შედეგების მოლეკულურ ასპექტში შეფასებას. აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ სახელმძღვანელოს ტექსტის სტრუქტურა და შინაარსი მკითხველისათვის ადვილად გასაგებია. სახელმძღვანელოში მითითებულია თემის ადეკვატური 150-ზე მეტი ლიტერატურული წყარო; ტექსტი დაყოფილია თავებად (შინაარსის გათვალისწინებით); ნაშრომი მოიცავს ტექსტში გამოყენებული ტერმინების დეტალურ განმარტებებს, რაც მკითხველს უქმნის ნაშრომის დადებითად შეფასების შთაბეჭდილებას და სხვა.

ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის სახელმძღვანელო: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“ საინტერესოა იმ თვალსაზრისითაც რომ ავტორები შეეცადნენ საკუთარი ინტერპრეტაციით და არსებული ლიტერატურული წყაროების გაანალიზებით შეეფასებინათ ამ სერიოზული დაავადების ეტიო-პათოგენეზი, რაც დასაფასებელია.

დადებით ფაქტად შეიძლება მივიჩნიოთ ისიც, რომ ნებისმიერი ქართულენოვანი სახელმძღვანელოს შექმნა, რომლის შინაარსიც ეხება თეორიულ და პრაქტიკულ მედიცინას (მაგალითად, ფსიქიატრიას, ონკოლოგიას, ნევროლოგიას და მედიცინის სხვა დარგებს) და ავტორებად გვევლინებიან ნიკოლოზისა და ოთარის თაობის ახალგაზრდები, საამაყოა.

ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის სახელმძღვანელო: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“ ვიმედოვნებ და მჯერა, დიდ ინტერესს გამოიწვევს მედიკო-ბიოლოგიური დარგებით დაინტერესებული ნებისმიერი ასაკის მკითხველებში და დაიმსახურებს სათანადო შეფასებას. აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ წარმოდგენილი სახელმძღვანელოს რედაქტორი ბრძანდება ივ.ჯავახიშვილი თბილისის სახ.უნივერსიტეტის ბიოქიმიის კათედრის გამგე, პროფესორი, ქალბატონი ნანა კოშორიძე.

ბიოლოგიის დოქტორი,
თსუ -ს პათოლოგიის კათედრის ასოცირებული პროფესორი,
თამილა ბაგაშვილი

თ. ჯავახიშვილი

რეცენზია

ნიკოლოზ ჟღენტისა და ოთარ ბიბილაშვილის სახელმძღვანელოს შესახებ: „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“

ფსიქიატრია, მედიცინის უმნიშვნელოვანესი დარგია, რომელიც, ამასთან, ერთ-ერთი ყველაზე ახალგაზრდა მეცნიერებაა, ხოლო ფსიქიკური აშლილობები, დაავადებებს შორის – ერთ-ერთი ყველაზე ნაკლებად შესწავლილი. ბუნდოვანია ფსიქიკურ აშლილობათა მოლეკულური მექანიზმების უმეტესობა. ამის გათვალისწინებით, მოლეკულური ფსიქიატრია და ნეიროფსიქიატრია ანუ დარგები, რომელებიც შეისწავლის ფსიქიკური და ნევროლოგიური აშლილობების მოლეკულურ საფუძვლებს, სულ მეტად აქტუალური ხდება. გასათვალისწინებელია ის ფაქტიც, რომ ფსიქიკურ აშლილობათა რაოდენობა მსოფლიოს მასშტაბით, სულ მეტად იზრდება, ხოლო მათი მკურნალობის მეთოდები ძალიან მწირია.

ნ.ჟღენტისა და ო.ბიბილაშვილის სახელმძღვანელო „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“, თავისი შინაარსითა და ფორმით უნიკალურია. იგი ორიენტირებულია ფსიქიკური აშლილობების ცხოველური მოდელებისა და მათი მოლეკულური მექანიზმების შესწავლის მეთოდებზე. მოცემულ სარეცენზიო წიგნში განხილული 200-ზე მეტი მეთოდი საშუალებას მისცემს მკვლევარს გაიაროს ტრანსლაციური კვლევის ყველა ეტაპი – ფსიქიკური აშლილობების თეორიული საფუძვლებიდან, მოლეკულურ მექანიზმებამდე. აღნიშნული მეთოდები გამოირჩევა მაღალი სიზუსტითა და დეტალიზაციით. სახელმძღვანელოს სანდოობას ზრდის და ამყარებს ის ფაქტიც, რომ იგი მაღალი დონის მრავალრიცხოვან სამეცნიერო ლიტერატურას ეფუძნება.

ვფიქრობ, აღნიშნული სახელმძღვანელო კარგ სამსახურს გაუწევს მედიცინისა და ბიოლოგიის მიმართულების სტუდენტებს, მაგისტრანტებსა და დოქტორანტებს, ასევე ახალგაზრდა მეცნიერებს მათ სამეცნიერო მუშაობაში. ამასგარდა, იგი ხელს შეუწყობს აღნიშნული დარგის პოპულარიზაციას და გაუმარტივებს მკვლევარებს მუშაობის პროცესს. უნდა აღინიშნოს, რომ სახელმძღვანელო გამოყენებას ჰპოვებს, არამხოლოდ სტუდენტებსა თუ ახალგაზრდა მკვლევარებს, არამედ, მათ ხელმძღვანელებს შორისაც. აღნიშნულ წიგნს აქტუალობას მატებს ის ფაქტიც, რომ მასში წარმოდგენილი მეთოდები, მაქსიმალურადაა მორგებული ქართული მეცნიერების რეალობას მისი მატერიალურ-ტექნიკური თავისებურებებით.

ვფიქრობ, რომ წარმოდგენილი სახელმძღვანელო „ექსპერიმენტული ნეიროფსიქიატრია: ცხოველური მოდელები და მოლეკულური კვლევის მეთოდები“ იმსახურებს უმაღლეს შეფასებას და მისი დროული გამოქვეყნება საშური საქმეა.

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
თსუ -ს ბიოქიმიის კათედრის ასოცირებული პროფესორი,
ელენე დავითაშვილი

