ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამა „ბიოლოგია“

მარიამ შენგელია

ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესი და კრეატინით მისი პრევენციის მექანიზმი

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
წარმოდგენილი დისერტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ნანა კოშორიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
სრული პროფესორი

თბილისი
2022 წელი

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University
Faculty of Exact and Natural Sciences

Doctoral Program: Biology

Mariam Shengelia

Creatine Facilitated Prevention of Stress Induced by the Violation of Natural Circadian Rhythm

The thesis work is performed to obtain a PhD academic degree in Biology

Scientific Supervisor: Nana Koshoridze
Doctor of Science Biology
professor

Tbilisi
2022 Year

აბსტრაქტი

ფიზიოლოგიური პროცესების დროში ორგანიზირება წარმოადგენს ბიოლოგიური სისტემის ფუნდამენტურ თვისებას და ეს პროცესი დამახასიათებელია ცოცხალი მატერიისათვის. ბიოლოგიური დროის სისტემების ჩამოყალიბება მიმდინარეობს განსაზღვრული გენეტიკური პროგრამით, რომლის დარღვევა ორგანიზმისათვის დამახასიათებელი უჯრედული ჰომეოსტაზის შეცვლას იწვევს. იმ ფაქტორებს შორის, რომლებიც განსაზღვრავენ ორგანიზმში მიმდინარე პროცესების რიტმულობას, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია სინათლისა და სიბნელის კანონზომიერი ცვლილება - ე.წ. ცირკადული რიტმი, რომლის დარღვევა ხშირ შემთხვევაში მიმდინარეობს უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ცვლილებით, ანაბოლური რეაქციების დაქვეითებით და სტრესული პროცესების განვითარებისა და მისი შედეგების მიზეზი ხდება. ამის გათვალისწინებით, მნიშვნელოვანია ისეთი ნაერთების მოძიება, რომლებსაც შესწევთ უნარი ქრონიკული სტრესის პირობებში მოახდინონ ამ პროცესების პრევენცია. ამ მხრივ, ჩვენი ყურადღება მიიპყრო კრეატინმა, რომელიც წარმოადგენს ენდოგენურ ნაერთს და აქტიურადაა ჩართული უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკულ პროცესებში და ამავე დროს გააჩნია ნეირომოდულატორული და ანტიოქსიდანტური თვისებებიც.

ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა კრეატინის პროტექტორული გავლენა სოციალური იზოლაციის პირობებში მიმდინარე დღე-ღამური ციკლის ხანგრძლივი დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად განვითარებულ ცვლილებებზე თეთრი ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედებში. ნანახია, რომ ვირთაგვას ორგანიზმში კრეატინის 30-დღიანი ყოველდღიური შეყვანა აუმჯობესებს ფსიქო- ემოციური სტრესის შედეგად გაუარესებულ როგორც ფიზიოლოგიურ მახასიათებლებს, ასევე ზოგიერთ ბიოქიმიურ მაჩვენებელსაც. კერძოდ, კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანისას ექსპერიმენტულ ცხოველებში ადგილი აქვს ფიზიოლოგიური მაჩვენებლების გაუმჯობესებას. პარალელურად, შეინიშნება ამ პირობებში გაზრდილი აზოტის ჟანგის, H_2O_2 და Ca^{2+}-ის იონის რაოდენობრივ შემცირება. მსგავსი შედეგები ასევე დაფიქსირდა Na^+/K^+-ატფ-აზას და Ca^{2+}-ATP-აზას შემთხვევაში. ცნობილია, რომ ფერმენტ Na^+/K^+-ATP-აზას აქტივობა კავშირშია გლუტამატურ NMDA რეცეპტორის

მუშაობასთან. სავარაუდოდ, ფერმენტ Na^+/K^+-ATP-აზას აქტივობის დაქვეითების მიზეზს წარმოადგენს სტრესის პირობებში NMDA-რეცეპტორის აქტივაცია და უჯრედში კალციუმის იონების რაოდენობის მატება. ამ უკანასკნელის გაზრდილი რაოდენობა კი ციტოტოქსიკურია და მთელი რიგ პათოლოგიური პროცესების განვითარებას უწყობს ხელს. ეს მოსაზრება დადასტურდა Na^+/K^+-ATP-აზას და NMDA-რეცეპტორის სუბერთეულების ექსპრესიის ხარისხის შესწავლის დროსაც. ამის პარალელურად, აღინიშნება დაქვეითებული ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების, კერძოდ სოდ-ისა და კატალაზას აქტივობის მატებაც. მიღებული შედეგების გათვალისწინებით, გამოთქმულია ვარაუდი, რომ კრეატინის შეყვანისას სტრესირებული ვირთაგების ჰიპოკამპის უჯრედებში ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის მატების მიზეზი შესაძლებელია იყოს მისი მონაწილეობით უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და ზოგიერთი უჯრედშიდა სასიგნალო გზების გააქტივება, რასაც მოსდევს სინთეზური რეაქციების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობის მატებაც. ამ მოსაზრების გათვალისწინებით შემდგომ ექსპერიმენტში ნაჩვენები იქნა, რომ ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა ჰიპოკამპის უჯრედებში ააქტივებს სტრესის შედეგად დაქვეითებულ ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების აქტივობასაც.

ცნობილია, რომ უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის მიმდინარეობის ერთერთ ცენტრალურ რეგულატორად ითვლება PI3K / Akt / mTOR სასიგნალო გზა, რომლის აქტივობა სხვადასხვა უჯრედგარე სიგნალებით იცვლება, მათ შორის განიხილება ასევე სტრესული ფაქტორები. ჩვენ შევისწავლეთ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში PI3K/ Akt / mTOR-ის კასკადის კომპონენტების რაოდენობრივი ცვლილებებიც და ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ამ პროცესზე. მიღებულმა შედეგებმაა აჩვენა, რომ ორგანიზმში კრეატინის შეყვანა ზრდის როგორც გააქტივებული mTOR-ის, ასევე მისი აქტივატორის Akt -ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზას (PI3K) სამიზნე ცილის რაოდენობას, რომელიც თავდაპირველად მცირდებოდა სტრესული პირობების შედეგად და გამოხატავს დაქვეითებულ ენერგეტიკული პროცესებს. ეს ვარაუდი დადასტურდა მონაცემებით, რომლებიც აჩვენებს Akt-ის უარყოფითი რეგულატორის, PTEN-ის გააქტიურებას სტრესის

პირობებში. შესაბამისად, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ კრეატინი ასრულებს თავის დადებით როლს NMDA რეცეპტორებზე მოდულატორული ზემოქმედებით, რაც იწვევს Ca^{2+} კონცენტრაციის და, შესაბამისად, PTEN-ის აქტიური ფორმის რაოდენობის შემცირებას, რითაც აქვეითებს მის ნეგატიურ გავლენას Akt-სა და mTOR-ზე.

ჩვენ ასევე შევისწავლეთ ე.წ. საათის გენების ცილოვანი პროდუქტების რაოდენობრივი ცვლილება ჰიპოკამპის უჯრედებში, როგორც ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით განპირობებული სტრესის ფონზე, ისე კრეატინის ეგზოგენური მიწოდების პირობებში, რითაც დავადგინეთ კავშირი ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართულ ფერმენტების ცვლილებასა და საათის გენების ცილოვან პროდუქტებს შორის, რომლებიც წარმოადგენენ ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს და ცენტრალური ადგილი უჭირავთ უჯრედული მეტაბოლიზმისათვის დამახასიათებელ ცირკადულ პროცესებში. ამ ცილების მოქმედების მექანიზმი დამყარებულია უჯრედისათვის დამახასითებელი სასიგნალო რეგულაციურ გზებზე ზემოქმედებით. მიღებული შედეგებით დადგინდა, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ადგილი აქვს საათის გენების მიერ სინთეზირებული ტრანსკრიფციული ფაქტორების რაოდენობის არაერთგვაროვან ცვლილებებს ჰიპოკამპში, თუმცა კრეატინის ეგზოგენური შეყვანა არ ახდენს გავლენას მათ რაოდენობრივ მაჩვენებელზე.

ამრიგად, შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ კრეატინის დადებითი ეფექტი ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევით განვითარებული სტრესის დროს ჰიპოკამპის უჯრედების ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე გამოწვეულია მისი მოდულატორული მოქმედებით PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო გზაზე და მიტოქონდრიული და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივაციის მიზეზი არ არის ტრანსკრიფციული ფაქტორების რაოდენობრივი ცვლილებები.

Abstract

Time organizing of physiologic processes is a fundamental feature of a biological system, which is a characteristic of all the living beings. Biological clock systems are formed by a specific genetic program and breaking this system causes changes in cellular homeostasis. Among the factors, that determine the rhythm of the ongoing processes in the body, Circadian rhythm is of paramount importance. In most cases Circadian rhythm disorder provokes changes in energy metabolism, and furthermore, triggers the development of stress processes. Considering the above-mentioned, it is crucial to discover the substances that can prevent these processes during stress. Our attention was drawn to Creatine. It is an endogenous substance in mammals used as a supplement during strenuous physical exertion. At the same time creatine is said to be characterized by a Neuromodulatory feature which in itself implies that it has an influence on the processes of nervous cells. It also has antioxidant properties.

Recent paper describes the impact of intraperitoneally injected creatine (140 mg/kg) into rats with a disturbed natural circadian rhythm for an extended period of time (30 days). Markedly, creatine-treated animals show positive changes in open-field behavioral parameters, and an increase in certain antioxidant enzymes' (SOD, catalase) activity in the hippocampus, whereas the concentration of nitric oxide, H_2O_2, and Ca^{2+} are approximated to the control value. Similar findings were also observed in case of Na^+/K^+- and Ca^{2+}-ATP-ases. It is known that the activity of the enzyme Na^+/ K^+-ATP-ase is related to the work of the glutamate NMDA-receptor. Presumably, the decrease in the activity of the enzyme Na^+/ K^+-ATP-ase is due to the activation of the NMDA-receptor under stress and the increase concentration of calcium ions in the cell. It is known that the increase of calcium ions is cytotoxic and contributes to the development of a number of pathological processes.

The experiments showed that intraperitoneal injections of Creatine during a prolonged disruption of circadian rhythm assist in activation of mitochondrial enzymes involved in energy metabolism in the hippocampus. Since the central regulatory substance in energy metabolism is the signaling molecule mTOR, we studied its quantitative changes under long-term disruption of circadian rhythm and influence of exogenous Creatine. The results revealed that exogenous supplementation of Creatine increases the amount of phosphorylated mTOR,

as well as its activator– Akt, which originally decreased as a result of stress conditions and express weakened energy metabolism processes. This assumption was also confirmed by our data, which show the activation of negative regulator of Akt, PTEN.

Accordingly,, it can be assumed that Creatine performs its positive role via its modulatory effects on NMDA receptors that lowers Ca^{2+} concentration and thus, reduces the amount of the active form of PTEN, thus diminishing the negative impact on Akt and mTOR.

We also studied quantitative changes in the protein products of clock genes in hippocampal cells. These genes reflect transcription factors that influence cell signal regulation mechanisms.The results showed that the number of transcription factors varies differently during stress, although exogenous creatine does not affect their quantitative value.

Consequently, it can be assumed that Creatine performs its positive role on the energy metabolism of hippocampal cells via its modulatory effects on the PI3K / Akt / mTOR signaling pathway and the reason for the activation of mitochondrial enzymes is not the quantitative changes of transcription factors.

სარჩევი

აბსტრაქტი 1

აბრევიატურები და შემოკლებები.....9

შესავალი.....12

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა 16

I.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები 16

I.2 ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეულ სტრესში მონაწილე ზოგიერთი ჰორმონის დახასიათება.....20

I.3 სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა 24

I.4 სტრესი და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი 28

I.5 PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტები.....32

I.6 კრეატინი.....35

I.7 სტრესი და მისი კრეატინით პრევენცია.....38.

I.8 NMDA რეცეპტორი და Na+/K+-ATP-აზა-ს სტრუქტურა.....41

I.9 ცირკადული რიტმი და საათის გენები.....42

თავი II. კვლევის ობიექტები და მეთოდები.....44

II.1 კვლევის ობიექტი 44

II.2 ფიზიოლოგიური ტესტი „ ღია ველის“ მეთოდი.....44

II.3. ჰორმონების რაოდენობების განსაზღვრა.....46

II.4. ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა.....46

II.5. ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა.....46

II.6. ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა.....47

II.7. ფერმენტ ალდოლაზას აქტივობის განსაზღვრა.....47

II.8. ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა.....48

II.9. მიტოქონდრიული ჰექსოკინაზას აქტივობა.....49

II.10. სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის განსაზღვრა.....49

II.11. კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა.....50
II.12. გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის განსაზღვრა.....51
II.13. აზოტის ჟანგის რაოდენობის განსაზღვრა.....51
II.14. Ca-ის რაოდენობის განსაზღვრა.....52
II.15. H_2O_2 -ის რაოდენობის განსაზღვრა.....52
II.16. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა MTT-ტესტით.....52
II.17. Ca^{2+}-ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა.....53
II.18. Na^{2+}, K^{+} -ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა.....53
II.19. ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდი.....54
II. 20. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით.....55
II. 21 სტატისტიკური ანალიზი.....56

თავი III. მიღებული მონაცემები.....57
III.1. თაგვების ქცევითი პარამეტრების განსაზღვრა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში.....57
III.2. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში ზოგიერთი ჰორმონის რაოდენობრივი ცვლილება.....58
III.3. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობაზე ეგზოგენური კრეატინის გავლენის შესწვლა.....61
III.4. კრეატინკინაზას კინეტიკური პარამეტრების (Vmax, Km) ცვლილება ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში.....63
III.5. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა PI3K / AKT / mTOR სასიგნალო გზაზე.....65
III.6. NO-სა, წყალბადის ზეჟანგისა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილებების დადგენა.....70
III.7. კრეატინის ეფექტი სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობაზე.....72
III.8. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის Ca^{2+}-ATPაზა-საქტივობაზე.....75

III.9. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა გლუტამატის NMDA-რეცეპტორისა და Na,K-ATP-აზა-ს სუბერთეულებისა რაოდენობაზე და მათი ფოსფორილირების ხარისხზე.....76
III.10. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა საათის გენების რაოდენობაზე.....79

თავი IV. მიღებული მონაცემების განხილვა.....81
მიღებული შედეგები 98
დასკვნა.....100
გამოყენებული ლიტერატურა.....102
გამოქვეყნებული პუბლიკაციები.....117
სამეცნიერო კონფერენციები.....118

აბრევიატურები და შემოკლებები

NAMPT-ნიკოტინამიდფოსფოტრანსფერაზა

SOD-სუპეროქსიდდისმუტაზა

ROS-ჟანგბადის აქტიური ფორმები

ONOO- -პეროქსინიტრიტი

NOS-აზოტის ოქსიდის სინთაზა

NO-აზოტის ოქსიდი

$O2^-$-სუპეროქსიდის რადიკალი

CK-კრეატინკინაზა

MT1-მელატონინის რეცეპტორი 1

MT2-მელატონინის რეცეპტორი 2

NMDA- გლუტამატის რეცეპტორი მგძნობიარე N-მეთილ D- ასპარტატის მიმართ

Bmal1 -საათის გენის ცილა

Cry 1, 2, 3 -საათის გენის ცილა კრიპტოქრომი

Per1, 2, 3 -საათის გენის ცილა პერიოდი

Clock-საათის გენის ცილა

NAD^+ -ნიკოტინამიდდინუკლეოტიდი

SAM-სიმპათიკური-ადრენო-მედულარული ღერძი

HPA-ჰიპოთალამუს-ჰიპოფიზური-თირკმელზედა ჯირკვლის სისტემა

TPH1-ტრიფტოფან ჰიდროქსილაზა 1

H_2O_2-წყალბადის ზეჟანგი

5-HTP-5-ჰიდროქსი-L-ტრიფტოფანი

AADC-5-ჰიდროქსიტრიფტოფან დეკარბოქსილაზა

CORT-კორტიკოსტერონი

HSP70 -სითბული შოკის ცილა 70

HSP90-სითბური შოკის ცილა 90

E-ეპინეფრინი

NE -ნორეპინეფრინი

DA -დოფამინი

MAO-მონოამინოქსიდაზა

COMT -კატექოლომეთილტრანსფერაზა

HVA-ჰომოვანილის მჟავა

VMA -ვანილილმანდელის მჟავა

Ach-აცეტილქოლინი

GPCR- G ცილებთან შეუღლებული რეცეპტორების ოჯახი

cAMP-ციკლური ადენოზინმონოფოსფატი

$L \cdot LOO^{\cdot -}$ -ლიპიდის რადიკალი

$NADPH_{2-}$ -ნიკოტინამიდდინუკლეოტიდფოსფატი

GPx-გლუტათიონ პეროქსიდაზა

PCr- ფოსფოკრეატინი

Cr-კრეატინი

ATP-ადენოსინტრიფოსფატი

ANT-ნუკლეოტიდის ტრანსპორტერი

FAD^{+} -ფლავინადენინდინუკლეოტიდი

FUM1-ფუმარაზას მაკოდირებელი გენი 1

PI3K- ფოსფატიდილინოზიტოლი 3-კინაზა

Akt-პროტეინკინაზა B

mTOR- სერინ/ტრეონინ კინაზური აქტივობის მქონე ცილა

mTORC1, 2- სერინ/ტრეონინ კინაზური აქტივობის მქონე ცილოს კომპლექსი 1, 2

TSC1–TSC2- სიმსივნის სუპრესორული გენები

4E-BP1- ტრანსკრიფციის რეპრესორული ცილა

S6K-რიბოსომული კინაზა

NMDAR- N-მეთილ-D-ასპარტატის რეცეპტორი

PKC-პროტეინკინაზა C

PKA- პროტეინკინაზა A

ERK1/2- უჯრედგარე სიგნალით რეგულირებადი პროტეინკინაზა

RRE-რეტინოილის მჟავას საპასუხო ელემენტი

შესავალი

ცნობილია, რომ ცოცხალი ორგანიზმი, როგორც თერმოდინამიკური სისტემა, გარემო არესთან ახდენს ენერგიისა და ნივთიერებათა ცვლას. ეს პროცესები განპირობებულია ენერგიის სხვადასხვა წყაროების, მათ შორის გარემო არეს განათების ხარისხით. ამ ტიპის სინქრონიზაციის პროცესი წარმოადგენს უჯრედული ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისა და გარემოსთან ადაპტაციის საფუძველს. დროში მიმდინარე პროცესების ძირითადი ტიპები, რომლებიც განაპირობებენ სინქრონიზაციას, წარმოადგენენ ე.წ. ბიოლოგიურ რიტმებს. განასხვავებენ სხვადასხვა ტიპის რიტმებს. მათ შორის დღე-ღამური (ცირკადიანული) და სეზონური (ცირკანუალური) რიტმები მაღალი ხარისხით დამოკიდებულნი არიან გარემო არეს განათების ინტენსივობაზე დღე-ღამის ან წელიწადის დროის განმავლობაში. ცნობილია, რომ ბიოლოგიური ცირკადული რიტმების ჩამოყალიბებისა და ფუნქციონირების პროცესში ჩართულია ეპიფიზი, რომელიც ასრულებს გარე სამყაროსა და ორგანიზმის შიდა გარემოს შორის შუამავლის როლს. ლიტერატურული მონაცემები მიუთითებენ, რომ სწორედ ეპიფიზია ორგანიზმში „ბიოლოგიურ საათი“, რომლის მუშაობის ინტენსივობა შესაბამისობაშია განათების ხარისხის ცვლილებასთან. ითვლება, რომ ანალიზატორული სისტემებიდან მიღებული ინფორმაცია გადის თავის ტვინის ლიმბურ სისტემაზე, კერძოდ ჰიპოკამპზე. ბოლო ხანებია, ჰიპოკამპს სხვადასხვა ფუნქციებთან ერთად, ასევე მიაწერენ ქრონოტროპული აქტივობის შესაძლებლობასაც, თუმცა ეს საკითხი ნაკლებადაა შესწავლილი. დადასტურებულია, რომ არსებობს ე.წ. საათის გენები, რომელთა ცილოვანი პროდუქტები (clock-genes proteins) ჩართულია უჯრედში მიმდინარე პროცესებში და განსაზღვრავენ მეტაბოლიზმის დამახასიათებელ ცირკადიანულ რიტმებს. მათი მაკოდირებელი გენებია: period (აკოდირებს ცილებს Per1, Per2 და Per3), cryptochrome (Cry1 და Cry2 ცილები) და clock (ცილა clock-ს და Npas2-ს), bmal 1 (ცილა Bmal 1 და Bmal 2). საათის გენების მიერ კოდირებული ცილები წარმოადგენენ ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს, რომლებისთვისაც დამახიათებელია სპეციფიკური bHLH- და PAS-დომენების არსებობა. ამ მხრივ, ინტერესს იწვევს PAS დომენი, რომელიც აქტივირდება სინათლით, შეუძლია დაუკავშირდეს ჰემს, O_2-ს, CO-ს, NO-ს და ასევე მგრძნობელობას

ავლენს მემბრანული პოტენციალის ცვლილებაზე. იმ ცილებს შორის, რომლებიც აქტიურად არიან ჩართული ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში და ფოტომგრძნობიარე PAS-დომენი გააჩნია, განიხილება Bmal1, Cry, Per1, Per2, Clock , Npas2, HIF1α და HIF1b ცილები, ასევე PASK (PAS-შემცველი კინაზა). PAS-დომენების შემცველი ცილების მრავალფეროვნება განაპირობებს საათის გენების მონაწილეობას ორგანიზმისათვის დამახასიათებელ ცირკადიანულ და სეზონური რეგულაციაში. მაგალითად, ნაჩვენებია, რომ ცირკადული რიტმით კონტროლდება იმ გენის აქტივობა, რომელიც აკოდირებს ფერმენტ ნიკოტინამიდფოსფოტრანსფერაზას (NAMPT). ამ ფერმენტს მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში, კერძოდ უჯრედში ენერგეტიკული პოტენციალის დაქვეითებას მოსდევს NAMPT-ის მიერ NAD^+-ის წარმოქმნის გააქტივება, რაც თავის მხრივ, აძლიერებს ჟანგვა-აღდგენით რეაქციებს და ხელს უწყობს უჯრედის ენერგეტიკული პოტენციალის ზრდას. ცირკადიანული რიტმის განსაზღვრულ ფაზაში NAD^+-ის რაოდენობის ზრდა იწვევს NAD-დამოკიდებული დეაცეტილაზის-სირტუინ-I-ისა და NAD^+-ADPრიბოზილტრანსფერაზას (PARP-1) აქტივაციას. თავის მხრივ, სირტუინ-1 აწარმოებს ისეთი ცილების დეაცეტილირებას, როგორიცაა Clock, Bmal1 და Per2. თავის მხრივ, ატფ-ის დონის შემცირება და ადენოზინმონოფოსფატების რაოდენობის ზრდა ც-ამფ-აქტივირებადი პროტეინკინაზას (AMPK) აქტივაციის მიზეზი ხდება, რომლისთვისაც საათის გენების ცილების ანალოგიურად, ერთერთ სამიზნეს წარმოადგენს სწორედ NAMPT. ამდენად, მიღებული შედეგები იძლევა იმის საფუძველს, რომ Clock, Bmal1, NAMPT, სირტუინ-1 და AMPK მივიჩნიოთ ენერგეტიკული ცვლის ერთერთ მნიშვნელოვან სენსორებად. NAMPT-ის ანალოგიურად, ენერგეტიკულ და ანტიოქსიდანტურ სისტემაში ჩართული სხვადასხვა ფერმენტის აქტივობა ასევე რეგულირდება საათის-გენების საშუალებით. ეს მონაცემები იძლევა საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ცირკადიანული რიტმის ცვლილება იწვევს მათი აქტივობის ცვლილებასაც, რაც საბოლოოდ აისახება მეტაბოლიზმის შეცვლასა და ქრონიკული სტრესის ჩამოყალიბებაში. მართლაც, მთელი რიგი ექსპერიმენტული კვლევები ადასტურებენ მჭიდრო კავშირს ცირკადიანული რიტმის დარღვევასა და ქრონიკულ სტრესს შორის. დადგენილია, რომ ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის ცვლილება დაკავშირებულია კოგნიტურ და

ქცევით დარღვევებთან, აგრესიულობის ზრდასთან, მოძრაობითი რეაქციების შემცირებასთან, მეხსიერებისა და დასწავლის გაუარესებასთან. ეს ცვლილებები ისეთი პათოლოგიების ანალოგიურია, როგორიცაა დეპრესია, შფოთი და სხვ. როგორც ცნობილია, ქრონიკული სტრესის პირობებში ორგანიზმში მიმდინარე მეტაბოლური ცვლილების მიზეზი ხდება ჰორმონალური სტატუსისა და უჯრედში სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებები, რასაც მოსდევს შესაბამისად ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და ანტიოქსიდანტური სტატუსის რღვევა, აქტიური რადიკალების რაოდენობრივი მატება და ჟანგვითი პროცესების გააქტივება, რაც აისახება ფერმენტების აქტივობისა და ტრანსკრიფციული და ტრანსლაციური პროცესების ინტენსივობის ცვლილებებით და ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბებით.

ამდენად, ისეთი ნივთიერებების მოძიება, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოახდინონ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია, განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს. ცნობილია რიგი ნაერთებისა, რომლებიც ამ მიზნით აქტიურად გამოიყენება პრაქტიკაში. მათ შორის განიხილება კრეატინი (α-N-მეთილგუანიდინო აცეტილის მჟავა), რომელიც წარმოადგენს ენდოგენურ, ორგანულ ნაერთს, რომელიც ფოსფოკრეატინთან ერთად მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში. რეაქცია კრეატინსა და ფოსფოკრეატინს შორის კატალიზირდება ფერმენტ კრეატინკინაზით (CK), რომლის იზოფორმები თითქმის ყველა ტიპის უჯრედებში გვხვდება, თუმცა მისი განსაკუთრებული აქტიურობით ხასიათდება მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნილების ქსოვილები, კერძოდ კუნთი და ტვინი. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ Cr სავარაუდოდ სხვა პროცესებშიაცაა ჩართული. ასეთებია მაგალითად, ნერვული იმპულსის გადაცემა, მემბრანული პოტენციალისა და იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედული ჰომეოსტაზი, უჯრედშიდა სასიგნალო გზების გააქტიურება, აქსონალური ტრანსპორტი და სხვა. Cr ასევე განიხილება როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლა მოახდინოს ზოგიერთი რეცეპტორების მოქმედების მოდულირებაც. დადგენილია, რომ მისი დეფიციტი, რომელიც დაკავშირებულია ტვინში მისი ტრანსპორტერის დეფექტით, უარყოფითად აისახება ტვინის ფუნქციონირებაზე და მთელი რიგი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების პირობებში შეინიშნება. ბოლო ხანებია

გამოჩნდა მონაცემები Cr–ის ანტიოქსიდანტური თვისებების შესახებაც. ანტიოქსიდანტური სისტემის დაქვეითების მიზეზი შესაძლებელია გახდეს სხვადასხვა სტრესორის ზემოქმედება, მათ შორის ცირკადული რიტმის დარღვევა. პროცესს თან ახლავს ენერგეტიკული დეფიციტი და თავის ტვინის ფუნქციური მდგომარეობის გაუარესება. ნანახია, რომ კრეატინის დამატება კვების რაციონში არეგულირებს კუნთებსა და ცნს-ში მიმდინარე პეროქსიდაციულ პროცესებს ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივაციის გზით. ამდენად, კრეატინი შესაძლებელია გამოყენებული იქნას როგორც პრევენციული საშუალება ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული მეტაბოლური პროცესების ნორმალიზირებისათვის.

პროექტის აქტუალობა: სამეცნიერო პროექტი აქტუალურია დღევანდელი ყოფითი ცხოვრების სტილიდან გამომდინარე. ყოველდღიური და ხშირი ცირკადული რიტმის და მასთან ერთად ბუნებრივი ძილ-ღვიძილის ციკლის დარღვევა, რაც თანამედროვე ცხოვრების თანმხვედრი მოვლენა გახდა, მთელი რიგი პათოლოგიების, მათ შორის ნეიროდეგენერაციული ტიპის დაავადებების განვითარების წინაპირობაა. ამ პროცესების მოლეკულური მექანიზმების დადგენა და შესაბამისად, პრევენციული ღონისძიებების გატარება ხელს შეუწყობს ცოცხალ სისტემაზე ქრონიკული სტრესის უარყოფითი გავლენის შემცირებას.

პროექტის მეცნიერული სიახლე: ნაშრომში პირველადაა შესწავლილი ჰიპოკამპის უჯრედებში მიმდინარე მეტაბოლური ცვლილებები ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში, რაც თავის ტვინის ამ უბნის პროცესში ჩართულობასა და მნიშვნელობზე მიუთითებს. ასევე პირველადაა შესწავლილი ამ პროცესებში ჰიპოკამპის უჯრედებში საათის გენების მოქმედების ხასიათი. მეცნიერულ სიახლეს წარმოადგენს კრეატინის, როგორც მოდულატორის, პრევენციული მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის დადგენაც ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევით გამოწვეული ქრონიკული სტრესის პირობებში.

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა

I.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები

ცნება „სტრესი“, როგორც ორგანიზმის მთლიანობის მუდმივობის შენარჩუმებისადმი მიმართული ადაპტაციური რეაქცია, პირველად კანადელმა ფიზიოლოგმა ჰანს სელიემ განიხილა. იგი სტრესს განმარტავს, როგორც ფიზიოლოგიური რეაქციების ერთობლიობას, რომელიც გამოწვეულია სხვადასხვა გარემო ფაქტორების ცვლილებით და მიზნად ისახავს სხეულის ჰომეოსტაზის აღდგენას, იწვევს რა ორგანიზმის დამცველობითი რეაქციების განვითარებას. აღსანიშნავია, რომ სელიეს განმარტება სრულად ვერ ასახავს სტრესის გამომწვევ ფაქტორებს და ასევე იმ გარემოებას, რომ ორგანიზმის პასუხი სტრესზე თავად ამ უკანასკნელის ფუნქციურ მდგომარეობაზეა დამოკიდებული [47; 30].

აღსანიშნავია, რომ ყველაზე სრულყოფილია სტეპტოუს მიერ შემოთავაზებული განმარტება, რომლის თანახმად „სტრესის პასუხი ვლინდება მაშინ, როცა ინდივიდისადმი წაყენებული მოთხოვნები აღემატება იმ პერსონალურ და სოციალურ რესურსებს, რომლის მობილიზაციის უნარიც შესწევს ინდივიდს“ [106].

თავდაპირველად მიაჩნდათ, რომ სტრესის გავლენა ორგანიზმზე ყოველთვის უარყოფითი იყო, თუმცა მოგვიანებით სტრესის გამომწვევი ფაქტორების ბუნებისა და მათი ზემოქმედების ხასიათის მიხედვით გამოიყო ორი ტიპი, კერძოდ დადებითი და უარყოფითი სტრესი. დადგინდა, რომ სტრესულ სტიმულებზე რეაგირება აერთიანებს თავის ტვინის სავადასხვა სტრუქტურების, რომლებსაც ერთობლივად შეუძლიათ მოვლენების აღმოჩენა და მათი ინტერპრეტაცია, როგორც რეალური ან პოტენციური საფრთხე. თუმცა სხვადასხვა ტიპის სტრესორები აკავშირებენ ტვინის სხვადასხვა ქსელს, რაც მოითხოვს დახვეწილ ფუნქციურ ნეიროანატომიურ და ნეირობიოქიმიურ დამუშავებას. თავად სტრესორის ინფორმაციის ამ ინტეგრაციამ შეიძლება გამოიწვიოს სტრესის რეაქციაში მონაწილე ორი ძირითადი კომპონენტის, კერძოდ, სიმპათიკური-ადრენო-მედულარული (SAM) ღერძის და ჰიპოთალამუს-ჰიპოფიზური-თირკმელზედა ჯირკვლის (HPA) გააქტიურება. აღსანიშნავია ისიც, რომ სტრესის პასუხის სირთულე არ შემოიფარგლება მხოლოდ ნეიროანატომიით ან

SAM და HPA ღერძების შუამავლებით, არამედ განსხვავდება სტრესორის ექსპოზიციის დროისა და ხანგრძლივობის, აგრეთვე მისი მოკლე და/ან გრძელვადიანი შედეგების მიხედვით [48].

სტრესის განვითარებასა და ჩამოყალიბებაში განარჩევენ სამ ძირითად ფაზას:

1. *საბრძოლო განგაშის სტადიას,* რომელიც მიმდინარეობს ორგანიზმის შინაგანი და გარეგანი ძალების მობილიზაციის ფონზე და გულისხმობს, რომ ინდივიდი მზადაა ბრძოლის ან გაქცევისათვის. ასეთ პირობებში, სტრესორის ზემოქმედების საპასუხოდ ორგანიზმში იწყება ადრენალინის, ადრენოკორტიკოტროპული ჰორმონისა და გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებული სეკრეცია, რასაც მოსდევს სიმპათიკური ნერვული სისტემის აქტიურობის გაძლიერება და ამის პარალელურად პათოლოგიური პროცესების განვითარება, რაც გამოიხატება ისეთი დაავადებების ჩამოყალიბებასა და განვითარებაში, როგორიცაა ნეიროდეგენერაციული ცვლილებები, საჭმლის მომნელებელი სისტემის ფუნქციონირების მოშლა, იმუნური სისტემის დაქვეითება, გულ-სისხლძარღვთა სისტემის პათოლოგიები და სხვ. ეს ცვლილებები შეიძლება ისეთი სიღრმის იყოს, რომ ორგანიზმის სიცოცხლისათვის სახიფათოც კი გახდეს. იმ შემთხვევაში, თუ ორგანიზმმა დაძლია ყოველივე ეს, ვითარდება ე.წ. რეზისტენტობის ფაზა;

2. *რეზისტენტობის* (აქტივაციის) ფაზა, რომელიც ხასიათდება გლუკოკორტიკოიდების დახმარებით არაკეთილსასურველი ზემოქმედების მიმართ ორგანიზმის გამძლეობის გაზრდით;

3. *ადაპტაციის* ან *გამოფიტვის* (დისტრესის) ფაზა. მესამე ფაზის განვითარება დამოკიდებულია იმაზე, თუ ადაპტაციური ენერგიის რა მარაგი გააჩნია ორგანიზმს. გამოფიტვის სტადიაში თირკმელზედა ჯირკვლები წყვეტს გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებულ სეკრეციას, რომელიც თავის მხრივ, დაცვის ჰორმონებს წარმოადგენს, რასაც მოსდევს ორგანიზმის მდგომარეობის გაუარესება და დამძიმება [99; 104].

სტრესი არღვევს რა ორგანიზმის ჰომესტაზს, იწვევს მთელ რიგ ცვლილებებს, რაც გამოიხატება ორგანიზმის ჰორმონალური სტატუსის და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებებით, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევით, ფერმენტული რეაქციების და გენის ექსპრესიის ხარისხის ცვლილებით და ა.შ. თავად ლიმბური სისტემის ისეთი კომპონენტები, როგორიცაა ჰიპოკამპი,

ამიგდალა და კორტექსი, მგრძნობიარეა ისეთი სტრესორების მიმართ, როგორიცაა შიში, შეზღუდვა და დაუცველობა გარემოსთან მიმართებაში [29].

სტრესის გამომწვევი უამრავი ფაქტორი არსებობს, მათ შორის აღსანიშნავია სოციალური იზოლაცია და ცირკადული რიტმი. ინდივიდის იზოლაცია სოციალური მოვლენაა, რომლის დროსაც კონტაქტებისა და ურთიერთობების შეწყვეტის ან მკვეთრი შემცირების შედეგადად ხდება ინდივიდის ან სოციალური ჯგუფის მოწყვეტა სხვა ინდივიდებისგან. ამ პერიოდში ჩატარებული კვლევებით დადგინდა მსგავსი ზემოქმედების უარყოფითი გავლენა ორგანიზმზე, მის ფუნქციონირებასა და სიკვდილიანობის მაჩვენებელზე. სოციალური იზოლაცია წარმოადგენს ძირითად რისკფაქტორს რამდენიმე ნეიროფსიქიატრიული აშლილობისთვის, მათ შორის შფოთვა და დეპრესია.

დადგენილია, რომ სოციალური იზოლაცია გავლენას ახდენს ორგანიზმის ფუნქციონირების სამ ძირითად მარეგულირებელ სისტემაზე, კერძოდ ნერვულზე, ენდოკრინულსა და იმუნურზე. ამ ფაქტორით გამოწვეული სტრესის შედეგად ვითარდება მთელი რიგი შემეცნებითი ფუნქციის დარღვევები, რასაც მოსდევს გარკვეული პათოლოგიური პროცესების განვითარება. მაგალითად, ქალებში სოციალური იზოლაციის შედეგად გაზრდილია ძუძუს კიბოს განვითარების ალბათობა [100].

სტრესის განვითარების რისკ-ფაქტორს მიეკუთვნება ასევე ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევაც. ცირკადული რიტმის ცნება შემოიღო ამერიკელმა ფიზიოლოგმა ფრანც ჰალბერგმა. იგი მომდინარეობს ლათინური სიტყვიდან „ circa dies”, რაც ნიშნავს „ დღის შესახებ“. ცნობილია, რომ ცოცხალი ორგანიზმი, როგორც თერმოდინამიკური სისტემა, გარემო არესთან ახდენს ენერგიისა და ნივთიერებათა ცვლას. ეს პროცესები განპირობებულია ენერგიის სხვადასხვა წყაროების, მათ შორის გარემო არეს განათების ხარისხით. ამ ტიპის სინქრონიზაციის პროცესი წარმოადგენს უჯრედული ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისა და გარემოსთან ადაპტაციის საფუძველს. დროში მიმდინარე პროცესების ძირითადი ტიპები, რომლებიც განაპირობებენ სინქრონიზაციას, წარმოადგენენ ე.წ. ბიოლოგიურ რიტმებს. განასხვავებენ სხვადასხვა ტიპის რიტმებს. მათ შორის დღე-ღამური (ცირკადიანული) და სეზონური (ცირკანუალური) რიტმები მაღალი ხარისხით დამოკიდებულნი არიან გარემო არეს

განათების ინტენსივობაზე დღე-ღამის ან წელიწადის დროის განმავლობაში. ცნობილია, რომ ბიოლოგიური ცირკადული რიტმების ჩამოყალიბებისა და ფუნქციონირების პროცესში ჩართულია ეპიფიზი, რომელიც ასრულებს გარე სამყაროსა და ორგანიზმის შიდა გარემოს შორის შუამავლის როლს. ლიტერატურული მონაცემები მიუთითებენ, რომ სწორედ ეპიფიზი წარმოადგენს ორგანიზმში „ბიოლოგიურ საათს“, რომლის მუშაობის ინტენსივობა შესაბამისობაშია განათების ხარისხის ცვლილებასთან. ამავე დროს ითვლება, რომ ანალიზატორული სისტემებიდან მიღებული ინფორმაცია გადის თავის ტვინის ლიმბურ სისტემაზე, კერძოდ ჰიპოკამპზე [9; 69]. ყველა ცოცხალი ინდივიდი განიცდის დღე-ღამის ბუნებრივი რიტმის ზემოქმედებას, რომელიც იგი ცოცხალი სისტემის ორგანიზაციის უჯრედულ, ორგანოთა, ორგანიზმულ და პოპულაციურ დონეებზე ვლინდება. სისხლის წნევა, მეტაბოლური პროცესები, გულისცემის სიხშირე, სხეულის ტემპერატურა და ჰორმონალური აქტივობა შინაგანი საათის მიხედვით იცვლება. გარდა ამისა, ცირკადული რიტმი არეგულირებს ათასობით გენის ექსპრესიას ქსოვილსპეციფიკური ეფექტებით და წარმოადგენ უჯრედული მეტაბოლიზმის ერთერთ მთავარი რეგულატორს როგორც სტრეს-ფაქტორების, ასევე სხვა მრავალი ფაქტორის ზემოქმედების საპასუხოდ. ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ცვლილებას შეუძლია გამოიწვიოს ისეთი პათოლოგიები, რომლებიც დაკავშირებულია კოგნიტურ და ქცევით დარღვევებთან, მეხსიერებისა და დასწავლის გაუარესებასთან და სხვა. აღსანიშნავია, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევა ხშირად აღინიშნება ისეთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების მქონე პაციენტებში, როგორიცაა ალცჰეიმერის დაავადება, პარკინსონის დაავადება, ჰანტინგტონის დაავადება და სხვა [81; 130].

სტრესის შედეგად უჯრედში განვითარებული ბიოქიმიური პროცესები ვლინდება ჰორმონალური და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებებით, ასევე ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევით, მთელი რიგი ფერმენტული სისტემების აქტივობის შეცვლით, რასაც მოსდევს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის გაძლიერება, ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობის დაქვეითება და სხვა მნიშვნელოვანი სისტემების აქტივობის ცვლილება, რაც უარყოფითად აისახება ორგანიზმის ფუნქციურ მდგომარეობაზე.

I.2 ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეულ სტრესში მონაწილე ზოგიერთი ჰორმონის დახასიათება

მელატონინი. მელატონინი, N-აცეტილ-5-მეტოქსიტრიფტამინი, არის ბუნებაში ყველგან გავრცელებული მოლეკულა, რომელიც გვხვდება თითქმის ყველა ცოცხალ ორგანიზმში. ეს არის ინდოლამინი, რომელიც ხერხემლიან ორგანიზმებში გამომუშავდება ეპიფიზის უჯრედებში-პინეალოციტებში N-აცეტილსეროტონინისაგან. დადგენილია, რომ სიმპათიკური ნერვული დაბოლოებებიდან გამონთავისუფლებული ნორადრენალი მოქმედებს ადრენერგულ რეცეპტორებზე პინეალოციტების მემბრანაში და ადენილატციკლაზური სისტემისა და ფოსფოლიპაზა C გააქტიურებით უზრუნველყოფს მის სინთეზს, რაც რეგულირდება ჰიპოთალამუსის პარავენტრიკულური ბირთვებიდან. მელატონინის სეკრეცია სისხლში ხდება ღამის საათებში და არეგულირებს დღე-ღამური რიტმს და მონაწილეობს სხვადასხვა ფიზიოლოგიური პროცესის ნორმალიზებაში. [5; 6]. იგი მონაწილეობს ენდოკრინული, იმუნური, ვეგეტატური და ცენტრალური ნერვული სისტემის მუშაობის რეგულაციაში [31; 37]. გარდა ამისა, მელატონინი წარმატებით გამოიყენება ოსტეოპოროზის, გლაუკომის, ალცჰეიმერის, პარკისონის და სხვა დაავადებათა სამკურნალოდ.

ცნობილია, რომ მელატონინი ერთ-ერთი ყველაზე ძლიერი ბუნებრივია ანტიოქსიდანტია, რომელიც უკავშირდება არა მხოლოდ ჟანგბადის და აზოტის რეაქტიული ფორმებს, არამედ მობილიზაციას უკეთებს უჯრედშიდა ანტიოქსიდანტურ ფერმენტულ სისტემას. სხვა ჰორმონების მსგავსად, მელატონინს გააჩნია მეტაბოტროპული რეცეპტორები: MT1 და MT2, რომლებიც შეუღლებულნი არიან Gi/Go და Gq ცილებთან, უზრუნველყოფენ რა ადენილატციკლაზური სისტემის დაქვეითებას და ფოსფოლიპაზა C აქტივაციას. MT1 და MT2 რეცეპტორები გვხვდება თითქმის ყველა პერიფერიულ ქსოვილში, ასევე ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. [6].

მრავალი კვლევის საფუძველზე დადგენილია, რომ მელატონინი სელექციურად დამთრგუნველ მოქმედებას ავლენს კიბოს უჯრედების გამრავლებაზე და ამუხრუჭებს

მათ მიტოზურ დაყოფას, თუმცა ეს მექნიზმი ჯერ კიდევ ბოლომდე არ არის შესწავლილი.[114].

სეროტონინი. ცნობილია, რომ სეროტონინი, როგორც ნეიროტრანსმიტერი არეგულირებს ძილს, მადას, განწყობას და თავის ტვინის სხვა მნიშვნელოვან ფუნქციებს, ხოლო როგორც პერიფერიული ჰორმონი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს სხვადასხვა ორგანოთა სისტემის შეთანხმებულ ფუნქციონირებაში. სეროტონინის უმეტესი ნაწილი ცირკულირებს სისხლძარღვში და ტრანსპორტირდება სისხლის თრომბოციტებით [55]. პერიფერიული სეროტონინის უმეტესი ნაწილი სინთეზირდება TPH1-ით ნაწლავის ენტეროქრომანულ უჯრედებში, გამოიყოფა სისხლში და შემდეგ შეიწოვება მოცირკულირე თრომბოციტების მიერ [13]. თრომბოციტები ინახავს სეროტონინს ძალიან მაღალ კონცენტრაციებში თავის მკვრივ გრანულებში (65მმმ) და გამოყოფს მას გააქტიურებისას. თავის ტვინში სეროტონინი წარმოადგენს ნეირომედიტორს, რომლის სინთეზი L-ტრიპტოფანის ჰიდროქსილირების საშუალებით ხდება. შედეგად წარმოიქმნება 5-ჰიდროქსიტრიპტოფანი (5-HTP). რეაქციას აკატალიზებს ფერმენტი ტრიპტოფანჰიდროქსილაზა (TPH), რომელიც ორგანიზმში ორი იზოფორმის (TPH1 და TPH2) სახით არსებობს. TPH1 სხვადასხვა ქსოვილში ნანახი, ხოლო TPH2 თავის ტვინისათვის დამახასიათებელი იზოფორმას წარმოადგენს. 5-HTP განიცდის ფერმენტულ დეკარბოქსილირებას, რის შედეგადაც წარმოიქმენა 5-ჰიდროქსიტრიფტამინი (5-HT), ანუ სეროტონინი. რეაქციას აკატალიზებს ფერმენტი 5-ჰიდროქსიტიფტოფანდეკარბოქსილაზა (AADC) [109]. სეროტონინს გააჩნია შვიდი რეცეპტორი, რომელთაგან ერთი წარმოადგენს იონოტროპულს, ხოლო დანარჩენი შეუღლებულია G-ცილებთან და ფუნქციონირებს მეორადი მესენჯერული სისტემის საშუალებით. სეროტონინი ჩართულია ჰემოსტაზის, გულისცემის, სისხლძარღვთა ტონუსის, ნაწლავის მოძრაობის, ღვიძლში, ძვალსა და ფილტვის არტერიებში გულის, ტვინის და სარძევე ჯირკვლის უჯრედების ზრდის განვითარებაში, ასევე გააჩნია იმუნორეგულაციური ფუნქცია. ამასთან, აღსანიშნავია სეროტონინერგული სისტემის ფუნქცია ე.წ. ცირკადული რიტმის ნორმალურ ფუნქციონირებაში, სადაც ის გვევლინება სინათლეზე დამოკიდებული რეაქციების მაკონტროლებელად და მონაწილეონს სტრეს-ჰორმონების გამოყოფის პროცესში [82].

კორტიკოსტერონი. თირკმელზედა ჯირკვლის გარე შრის უჯრედები გამოიმუშავებენ ერთერთ მნიშვნელოვან სტეროიდულ ჰორმონს - კორტიკოსტერონს (CORT), რომელიც სამეცნიერო ლიტერატურაში ცნობილია „სტრეს-ჰორმონის“ სახელწოდებით და წარმოადგენს სტრესული მდგომარეობის შეფასების მარკერს. დადგენილია, რომ ჰიპოთალამუს-ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის (HPA) ფუნქციური კავშირი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს სხვადასხვა მეტაბოლური პროცესების ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში და არეგულირებს ცირკადულ და სტრესთან დაკავშირებული პროცესებს. ქრონიკული და მძიმე ფსიქოლოგიური სტრესი იწვევს HPA-ს ჰიპერაქტიურობას და კორტიკოსტეროიდების ჰიპერსეკრეციას [90]. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ გლუკოკორტიკოიდების გუკონეოგენეზის პროცესში მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ, რაც აუცილებელია უჯრედშიდა გლიკოგენის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისათვის. კორტიკოსტერონის წინამორბედს წარმოადგენს პრეგნენოლონი, რომელიც ციტოქრომ P450-ის ორი იზოფორმის (P450c21 და P450c11) მონაწილეობით მიმდინარე ფერმენტული რეაქციის შედეგად გარდაიქმნება კორტიკოსტერონად. ცნს-ში არსებობს ორი ტიპის კორტიკოსტეროიდული რეცეპტორი, თუმცა სტრეს-ჰორმონის სპეციფიური რეცეპტორები ნანახია ასევე სხვა ქსოვილებშიც. ორივე ტიპის კორტიკოსტეროიდული რესეპტორი ლიგან-აქტივირებადი ტრანსკრიპციული ფაქტორების სუპეროჯახების წარმოამდგენელია და ციტოპლაზმაში ასოცირებულია სითბური შოკის ცილების (HSP70 და HSP90) კომპლექსთან, რომლებიც მონაწილეობენ ტრანსკრიპციული პროცესებში. [63; 32]

კატექოლამინები. კატექოლამინები მიიღება ამინომჟავის თიროზინისგან და მოიცავს ეპინეფრინს (E), ნორეპინეფრინს (NE) და დოფამინს (DA). კატექოლამინების გამომყოფი უჯრედები ახორციელებენ თიროზინის სერიულად გარდაქმნის რეაქციებს L-DOPA-ში და შემდეგ DA-ში. უჯრედის ტიპის მიხედვით, DA შემდგომში გარდაიქმნება ნორადრენალინად ან ბოლოს გადავა ადრენალინში. კატექოლამინები ძირითადად წარმოიქმნება თირკმელზედა ჯირკვლის მედულას ქრომაფინურ უჯრედებში და პოსტგანგლიურ ბოჭკოებში სიმპათიკურ ნერვულ სისტემაში. დოფამინი, რომელიც მოქმედებს როგორც ნეიროტრანსმიტერი ცენტრალურ ნერვში სისტემა, ძირითადად წარმოიქმნება ნეირონის სხეულებში, ხოლო NE და DA ასევე

მოქმედებენ, როგორც ნეირომოდულატორები ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში და როგორც ჰორმონები სისხლის მიმოქცევის სისტემაში, ხოლო NE არის პერიფერიული ნეირომოდულატორი სიმპათიკური ნერვული სისტემისა და იმყოფება სისხლში [62; 90]. კატექოლამინების დაშლა მათ მეტაბოლიტებამდე ხდება მონოამინოქსიდაზას (MAO) მიერ, რომელიც მდებარეობს უჯრედის გარე მიტოქონდრიულ მემბრანაში და/ან კატექოლომეთილტრანსფერაზას (COMT) მიერ, რომელიც გვხვდება უჯრედის ციტოზოლში. MAO და COMT ახდენს ნორეპინეფრინის და ეპინეფრინის კატაბოლიზმს ვანილილმანდელის მჟავად, ხოლო დოფამინი ჰომოვანილის მჟავად (HVA). ორივე მათგანი VMA და HVA გამოიყოფა შარდით [2; 79].

მას შემდეგ, რაც გარე სტიმული იწვევს სხეულის სტრესულ რეაქციას, აქტიურდება ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის ღერძი და ავტონომიური ნერვული სისტემის სიმპათიკური განყოფილება. გლუკოკორტიკოიდების გამომუშავება იზრდება თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქში და აცეტილქოლინი (Ach) გამოიყოფა სიმპათიკური ნერვებისგან. Ach უკავშირდება ნიკოტინის რეცეპტორებს, რომლებიც განლაგებულია თირკმელზედა ჯირკვლის ტვინში ქრომაფინის უჯრედების მემბრანაზე. ეს რეცეპტორები ხელს უწყობენ კატექოლამინით სავსე ვეზიკულების ეგზოციტოზს სისხლში ტრანსპორტირებისთვის. სისხლში კატექოლამინები უკავშირდება ალფა და ბეტა-ადრენერგულ რეცეპტორებს, G ცილებთან შეუღლებული რეცეპტორების ოჯახს (GPCRs). ეს ალფა და ბეტა რეცეპტორები შემდგომ იყოფა ქვეტიპებად და ახორციელებენ ც-ამფ-ს (cAMP) ან ფოსფოინოზიტოლური მეორადი მესინჯერული სისტემების ჩართვას, რათა გააქტიურონ იონური არხები, რომლებიც საბოლოოდ განაპირობებენ სხეულის სიმპათიურ რეაქციას.

სიმპათიკური ნერვული სისტემის პასუხი „ბრძოლა ან გაქცევა“ არის კატექოლამინების მრავალსისტემური მოქმედების პირდაპირი შედეგი. თირკმელზედა ჯირკვლის ტვინიდან სეკრეცია, რომელიც წინ უძღვის სიმპათიკური ნერვული სისტემის აქტივაციას, არეგულირებს არტერიულ წნევას სისხლძარღვთა გლუვი კუნთის შეკუმშვით (ალფა-1 რეცეპტორების მეშვეობით). სისხლძარღვებთან დაკავშირებულ ადრენერგულ რეცეპტორებს აქვთ განსაკუთრებით მაღალი მიდრეკილება ნორეპინეფრინის მიმართ სხვა ამინებთან შედარებით.

კატექოლამინების შემდგომი ნერვ-კუნთოვანი მოქმედებები მოიცავს გულის კუნთის გაძლიერებულ შეკუმშვას (ბეტა-1 რეცეპტორების), გლუვი კუნთების რელაქსაციას კუჭ-ნაწლავის ტრაქტში და ა. შ. ეპინეფრინიც და ნორეპინეფრინიც ახორციელებენ სისხლში გლუკოზის დონის რეგულირებას ღვიძლში გლიკოგენოლიზის სტიმულირებით (ბეტა-2 რეცეპტორები), გლუკაგონის სეკრეციის გაზრდით (ბეტა-2 რეცეპტორები), ინსულინის სეკრეციის შემცირებით (ალფა-2 რეცეპტორები) პანკრეასიდან და ლიპოლიზის პროცესზე ზემოქმედებით ცხიმოვან ქსოვილში (ბეტა-3 რეცეპტორები).

კატექოლამინები ჩართულია მრავალი დაავადებისა და დაავადების პროცესის ფარმაკოლოგიურ მკურნალობაში. ეპინეფრინი და ნორეპინეფრინი ხშირად გამოიყენება როგორც ვაზოპრესორული აგენტები მწვავე ჰიპოტენზიური მდგომარეობის სამკურნალოდ, ასევე კატექოლამინების უკუშთანთქმის ფარმაკოდინამიკური ინჰიბირება ჩვეულებრივ გამოიყენება ზოგიერთი დეპრესიული აშლილობის, პოსტტრავმული სტრესული აშლილობის ფსიქიატრიულ მკურნალობაში [35; 123].

I.3 სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა

ცნობილია, რომ სტრესის თანაობისას ცოცხალ ორგანიზმში მთელი რიგი მეტაბოლური პროცესების ცვლილება ხდება, რაც გამოიხატება თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნით, უჯრედშიდა კალციუმის რაოდენობრივი ცვლილებებით, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითებით, ჰორმონალური ბალანსის და სხვა მნიშვნელოვანი უჯრედული ცვლილებებით.

ორგანიზმში მიმდინარე ბიოქიმიურ პროცესებს შორის განსაკუთრებული ადგილი თავისუფალ რადიკალური ჟანგვას უკავია. თავისუფალი რადიკალი წარმოადგენს მოლეკულას, რომელსაც აქვს გაუწყვილებელი ელექტრონი გარე ელექტრონულ ორბიტალზე და ხასიათდება მაღალი რეაქციის უნარიანობით და მათი მუდმივი კონცენტრაცია უჯრედში ყოველთვის ძალიან ცოტაა [104].

ორგანიზმში თვისუფალი რადიკალები შეიძლება დავყოთ: ბუნებრივ და გარეშე ფაქტორებით წარმოქმნილ რადიკალებად. ამ უკანასკნელთა ინიცირება ხდება

ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მოქმედებით. მაგალითად, მაიონიზირებელი (რენტგენის სხივები) და ულტრაიისფერი რადიაცია (ფიზიკური) და ქსენობიოტიკები (ორგანიზმისათვის უცხო ქიმიური ნაერთი).

ბუნებრივი რადიკალები თავის მხრივ იყოფა: პირველად, მეორეულ და მესამეულ რადიკალებად (ანტიოქსიდანტების რადიკალები). პირველად რადიკალებს მიეკუთვნება სუპეროქსიდი (·OO-), ნიტროქსიდი (NO), უბიქინონი (·Q). სუპეროქსიდის მეტაბოლური გარდაქმნის შედეგად შეიძლება წარმოიქმნას აქტიური მოლეკულური ნაერთები: წყალბადის ზეჟანგი, ჰიპოქლორიდი და ლიპიდების ჰიდროზეჟანგი.

პირველადი რადიკალების ურთიერთქმედებისა და ცვლადი ვალენტობის მეტალების თანაობისას (განსაკუთრებით Fe^{2+}) წარმოიქმნება სხვადასხვა ტიპის რადიკალები, მაგალითად ჰიდროქსილის (·OH), ლიპიდის რადიკალი (L · LOO·) და სხვა, რომლებიც წარმოადგენენ მეორეულ რადიკალებს. ეს უკანასკნელნი სახიფათოა ორგანიზმისთვის. ისინი წარმოიქმნებიან პირველადი რადიკალების უკონტროლო ზრდითა და მათი შემდგომი მოდიფიცირებით [127] .

თავისუფალი რადიკალების ჭარბი რაოდენობა აზიანებენ ცილებს, თავისუფალ ამინომჟავეებს, ლიპიდებს, ლიპოპროტეინებს, ნუკლეინის მჟავეებს, იწვევენ ლიპიდების ზეჟანგვით დაჟანგვას, რაც ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას, უჯრედის დაზიანებას და და საბოლოოდ ორგანიზმის დაღუპვას. უჯრედის დაღუპვის მიზეზი ლიპიდების პეროქსიდაციის დროს ხდება წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალების სიჭარბე, რომლებიც აზიანებენ უჯრედულ სტრუქტურებს, განსაკუთრებით მემბრანას და იწვევს მისი ფუნქციონირების ცვლილებას. აღსანიშნავია, რომ პეროქსიდაციის პროცესი ორგანიზმში მუდმივად მიმდინარეობს, რასაც განსაკუთრებული მნიშვნელობა გააჩნია, ვინაიდან მისი საშუალებით ხდება დაბერებული და დაავადებული უჯრედებისა და მოლეკულების დაშლა და მათი დაგროვების აცილება, თუმცა იმ შემთხვევაში, როცა ეს პროცესები განსაკუთრებით აქტიურდება ადგილი აქვს ე.წ. *ოქსიდაციური სტრესის* გააქტიურებას და განვითარებას [1; 130].

ორგანიზმში მუდმივად მიმდინარეობს თავისუფალ-რადიკალური პროცესები და შესაბამისად, აღნიშნული რეაქციების ხელშემწყობი ფაქტორების ანუ

პროოქსიდანტური სისტემის გაძლიერება, იწვევს ორგანიზმის ჰომეოსტაზის მოშლას, რაც მრავალი პათოლოგიის ჩამოყალიბების საწინდარია. აღნიშნული ნეგატიური მოვლენის თვიდან აცილების მიზნით ორგანიზმში ჩამოყალიბებულია მძლავრი *ანტიოქსიდანტური სისტემა*, რომელიც არეგულირებს უჯრედში თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის ინტენსივობას და ამ უკანასკნელების მომატების შემთხვევაში, ახდენს აქტიური რადიკალების გაუვნებელყოფას და ორგანიზმის დაცვას. ცოცხალი სისტემის ანტიოქსიდანტური სისტემა წარმოდგენილია ფერმენტული და არაფერმენტული კომპონენტებით, რომლებსაც შეუძლიათ მოახდინონ ჭარბი რაოდენობის აქტიური რადიკალების დაჭერა და მათი განეიტრალება. ნორმაში პროოქსიდანტური და ოქსიდანტური სისტემის აქტივობა წონასწორობაშია. ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტებია სუპეროქსიდდისმუტაზა (სოდ), კატალაზა, გლუტათიონდამოკიდებული პეროქსიდაზები და სხვ. [104].

სუპეროქსიდდისმუტაზა წარმოადგენს ანტიოქსიდანტური სისტემის ძირითად ფერმენტს, რომელიც ახდენს პეროქსიდაციის პროცესში წარმოქმნილი სუპეროქსიდის დისმუტაციას ჟანგბადად და წყალბადის ზეჟანგად და ამდენად იგი გვხვდება პრაქტიკულად ყველა უჯრედში. ცნობილია სოდ-ის 4 ძირითადი ტიპი, რომლებიც განსხვავდებიან ლოკალიზაციითა და კოფაქტორის მიხედვით. მაგნიუ-დამოკიდებული სოდ (MnSOD) ძირითადად ლოკალიზირებულია მიტოქონდრიის მატრიქსში, Cu/Zn-დამოკიდეგული სოდ (Cu/ZnSOD) გვხვდება ეუკარიოტული უჯრედების ციტოზოლში, რკინა-დამოკიდებული იზოფორმა (FeSOD) წარმოადგენს მცენარეული უჯრედის ციტოზოლურ ფორმას, ხოლო ექსტრაცელულარული (ECSOD) ფორმა - ძუძუმწოვრების სითხეებში ან მემბრანაში. Cu/ZnSOD მკვეთრად განსხვავდება MnSOD-ის ან FeSOD -გან. იგი დიმერული ფერმენტია, რომელიც ორი სუბერთეულითაა წარმოდგენილი (თითოეული მათგანი 16კდალტონი) და შეიცავს 153 ამინომჟავურ ნაშთს. სუბერთეულების დისოციაცია გამოწვეულია მოლეკულის შიგნით არსებული HS-ჯგუფების ალკილირებით ან თუთიისა და სპილენძის იონების გამოდევნით. Cu/ZnSOD-ის გენის ექსპრესია მიიღწევა ოქსიდაციური სტრესის მედიატორებით ან სულფჰიდრილური ანტიოქსიდანტებით და ასევე ინტერლეიკინი 1-ით და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორით [83; 98].

კატალაზა წარმოადგენს ასევე ანტიოქსიდანტურ ფერმენტს, რომელიც აკატალიზირებს ბიოლოგიური ჟანგვის შედეგად წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგის დაშლას შემდეგი რეაქციით $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. ფერმენტი გვხვდება ყველა ტიპის ორგანიზმში და აქტიურადაა ჩართული ქსოვილოვანი სუნთქვის პროცესში. ქიმიური აგებულებით იგი ჰემოპროტეინია, რომელიც შედგება ოთხი იდენტური სუბერთეულისაგან, სადაც თითოეული მათგანი პროსთეტული ჯგუფის სახით შეიცავს სამვალენტია რკინას (Fe3+). ფერმენტის ცილოვანი ნაწილი სახეობრივად სპეციფიკურია [108].

გლუტათიონპეროქსიდაზა (GPx) ასრულებს კატალიზატორის როლს ლიპიდების პეროქსიდაციის პროცესში წარმოქმნილი ზეჟანგის განეიტრალებაში აღდგენილი გლუტათიონის დახმარებით, რომელიც რეაქციის პროცესში იჟანგება. იგი კატალაზას ანალოგიურად ახდებს ზეჟანგის განეიტრალებას, თუმცა ამ უკანასკნელისაგან განსხვავებით გაცილებით მგრძნობიარეა წყალბადის ზეჟანგის დაბალი კონცენტრაციების მიმართ. ზოგიერთ ქსოვილში (გული, თავის ტვინი), სადაც განსაკუთრებით დაბალია კატალაზას აქტივობა, გლუტათიონპეროქსიდაზა ასრულებს ძირითადი ანტიოქსიდანტური ფერმენტის როლს. რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი დაჟანგული გლუტათიონი მყისიერად აღდება მეორე ფერმენტის - გლუტათიორედუქტაზას დახმარებით, რომელიც რეაქციისათვის იყენებს პენტოზოფოსფატური ციკლის დროს წარმოქმნილ აღდგენილ $NADPH_2$-ს.

ანტიოქსიდანტური ფერმენტების შედეგად დაჟანგული ლიპიდები მთლიანად აღდებიან ან გარდაიქმნებიან ნაკლებად ტოქსიკურ ნაერთებად, რაც იცავს უჯრედის მემბრანის ლიპიდებს თავისუფალი რადიკალების მოქმედებისაგან. GPx, ისევე როგორც სოდი, წარმოადგენს მეტალოფერმენტს, რომლის თითოეული მოლეკულის წარმოქმნისათვის აუცილებელია 4 ატომი სელენის (Se) არსებობა. სელენის არარსებობისას ადგილი აქვს მეორე ფერმენტის გლუტატიონ-Sტრანსფერაზას წარმოქმნას, რომელიც მიუხედავად იმისა, რომ წარმოადგენს მნიშვნელოვან ფერმენტს, ვერ ასრულებს GPx-ს ფუნქციას. ცნობილია GPx-ს რამდენიმე იზოფორმა, რომლებიც სხვადასხვა გენების მოქმედების პროდუქტს წარმოადგენენ და ახასიათებს მაღალი ხარისხის ქსოვილსპეციფიკურობა[16].

ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური სისტემა ანტიოქსიდანტური ფერმენტების გარდა, წარმოდგენილია ასევე ზოგიერთი ნაერთითა და მინერალით, რომლებიც ასევე აქტიურად არიან ჩართული ანტიოქსიდანტური სისტემის ფუნქციონირებაში. ასეთ ნაერთებს მიეკუთვნება ასევე ზოგიერთი ვიტამინი, მაგალითად ტოკოფეროლი (ვიტამინი E), ასკორბინის მჟავა (ვიტამინი C), ვიტამინი A (რეტინოლი) და კაროტინოიდები. ამ ვიტამინების მოქმედების ხასიათი განსხვავებულია. მაგალითად ვიტამინი E, რომელიც უჯრედის მემბრანში „ჩაშენებით" თავიდან იცილებს უჯრედზე თავისუფალი რადიკალების შემოტევას და მათ დამაზიანებელ ეფექტს. იგი ასევე აჩერებს ზეჟანგურ პროცესებს და ასტაბილიზირებს უჯრედშიდა პროცესებს. ეს ანტიოქსიდანტი ანელებს დაბერების პროცესს და ხელს უწყობს რიგი დაავადებების ჩამოყალიბების შეჩერებას. ისეთი ანტიოქსიდანტი, როგორიცაა ვიტამინი C, თავის მხრივ ხელს უშლის თავისუფალი რადიკალების მოქმედებას წყლიან გარემოში. მისი დეფეციტი პირველ რიგში აისახება იმუნური სისტემის ფუნქციონირებაზე [50; 109].

ანტიოქსიდანტური სისტემის ფუნქციონირებაში განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება სხვადასხვა ანტიოქსიდანტურ მინერალებს. მაგალითად სელენი, რომელიც გლუტატიონპეროქსიდაზას აქტიური ცენტრის შემადგენელი კომპონენტია, უზრუნველყოფს ბიოლოგიური მემბრანების დაცვას თავისუფალი რადიკალების ზემოქმედებისაგან. სელენის ანალოგიურად, ანტიოქსიდანტური თვისებებით გამოირჩევა თუთია, რომელიც მრავალი ფერმენტის (დაახლოებით ასი ფერმენტი) შემადგენელი კომპონენტია. უწყობს რა ხელს დნმ-ისა და რნმ-ის რეპლიკაციას, იგი აქტიურადაა ჩართული ახალი უჯრედების წარმოქმნის პროცესში. ანალოგიური როლი ენიჭება სპილენს, რომელიც ასევე სხვადასხვა ფერმენტის, მათ შორის სოდ-ის კომპონენტია და მისი ქრონიკული დეფიციტი აქვეითებს ორგანიზმის წინააღმდეგობის უნარს სხვადასხვა ტიპის ინფექციების მიმართ[17].

I.4 სტრესი და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი

ცნობილია, რომ ყველა უჯრედი ცხოველქმედებისათვის საჭიროებს ენერგიას, რომლის ძირითად წყაროს წარმოადგენს ატფ. ნორმალურ პირობებში ატფ-ის ძირითადი ნაწილი სინთეზირდება მიტოქონდრიაში ჟანგვითი ფოსფორილირების

გზით. დარჩენილი კი წარმოიქმნება გლიკოლიზის შედეგად. უჯრედის ყოველგვარი აქტივობა ხორციელდება ატფ-ის ჰიდროლიზის შედეგად გამონთავისუფლებული ენერგიის ხარჯზე, ამიტომაც ატფ-ის მუდმივი დონის შენარჩუნება სასიცოცხლო მნიშვნელობის ჰომეოსტატიკური ფუნქციაა [126].

ატფ-ს ჰომეოსტაზის შენარჩუნებას უზრუნველყოფს კრეატინ/კრეატინკინაზა/ ფოსფოკრეატინის (Cr/CK/PCr) სისტემა, რომელიც ასვე კრეატინკინაზული სისტემის სახელითაა ცნობილი და განსაკუთრებით აქტიურად მიმდინარეობს ნერვულ და კუნთოვან ქსოვილში, ანუ მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნილების უჯრედებში. კრეატინის (Cr) პლეიოტროპული ეფექტები ძირითადად დაფუძნებულია ფერმენტ კრეატინკინაზას (CK) და მისი მაღალენერგეტიკული პროდუქტის ფოსფოკრეატინის (PCr) ფუნქციებზე. მულტიდისციპლინურმა კვლევებმა დაადგინა CK/PCr სისტემის მოლეკულური, უჯრედული, ორგანოთა და სომატური ფუნქციები, კერძოდ იგი სწრაფად და დინამიურად აღადგენს დახარჯული ატფ-ს დონეს და აკავშირებს ATP წარმოების ადგილებს (გლიკოლიზი და მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორილირება) ატფ-ის გამოყენების უჯრედულ უბნებთან (ATP-აზები). CK/PCr სისტემა ეყრდნობა სუბსტრატებისა და პროდუქტების მჭიდრო გაცვლას CK იზოფორმებსა და ATP წარმომქმნელ ან მომხმარებელ პროცესებს შორის. მიტოქონდრიული CK მიტოქონდრიის გარე მემბრანაზე მჭიდროდ არის დაკავშირებული ატფ-ის ექსპორტთან ადენინური ნუკლეოტიდის ტრანსპორტერების (ANT) მეშვეობით და, შესაბამისად, ატფ-სინთეზისა და რესპირატორული ჯაჭვის აქტივობასთან, ათავისუფლებს რა PCr-ს ციტოზოლში. ეს დაკავშირება ასევე ამცირებს რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) წარმოქმნას და აფერხებს მიტოქონდრიულ გამტარიანობას, რაც წინამდებარე მოვლენას წარმოადგენს აპოპტოზის დროს. თავად კრეატინი შეიძლება ასევე მოქმედებდეს როგორც პირდაპირი და/ან არაპირდაპირი ანტიოქსიდანტი, ხოლო PCr-ს შეუძლია ურთიერთქმედება უჯრედულ მემბრანებთან და მათი დაცვა დაზიანებისაგან. ამიტომაც სისტემა მიჩნეულია უჯრედის ფუნქციონირების მნიშვნელოვან მეტაბოლურ რეგულატორად, რომლის მოშლა მთელი რიგი პათოლოგიის განვითარების მიზეზი შეიძლება გახდეს [124; 141].

აღსანიშნავია, რომ CK-ს აქტივობის დაქვეითება ასევე განიხილება, როგორც ასაკთან დაკავშირებული ნეიროდეგენერაციული დაავადებების მნიშვნელოვანი

მარკერი და მისი ფუნქციონირების დარღვევა წარმოადგენს ერთ-ერთ საკვანძო საფეხურს ნეიროდეგენერაციული ცვლილებების გზაზე.

ექსპერიმენტულად ნაჩვენებია, რომ ხანგრძლივი სტრესის შედეგად თავის ტვინში ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი მცირდება. ეს გამოიხატება ამ პროცესში მონაწილე ფერმენტების (სუქცინატდეჰიდროგენაზა, ფუმარაზა, აკონიტაზა, ალდოლაზა) და Cr/CK/PCr სისტემის აქტივობის დაქვეითებით.

ალდოლაზა გლიკოლიზში მონაწილე ერთერთი მნიშვნელოვანი ფერმენტია, რომელიც აკატალიზებს ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატს გარდაქმნას გლიცერალდეჰიდ-3- ფოსფატად და დიჰიდროქსიაცეტონფოსფატად. ალდოლაზები იყოფა სამ ჯგუფად: კლასი-I, კლასი-IA და კლასი-II; ყველა კლასს აქვს მსგავსი სტრუქტურული მახასიათებლები, მაგრამ დაბალი ამინომჟავების იდენტურობა. მისი ცნობილი სამი იზოფორმიდან A-ფორმა გვხვდება ემბრიონული განვითარების დროს, ასევე ღვიძლში და ნაწლავებში. მეორე იზოფორმა B გვხვდება დიდი რაოდენობით ღვიძლში და მისი ნაკლებობა გლიკოლიზური პროცესების დაქვეითებას იწვევს. ალდოლაზები ასრულებენ არაფერმენტულ ფუნქციებსაც, რაც გამოიხატება სხვა ცილბთან დაკავშირების უნარით, რომლებიც გავლენას ახდენენ უჯრედულ სიგნალიზაციასა და ტრანსკრიფციის მიმდინარეობაზე [93].

აკონიტაზა ლიმონმჟავა ციკლის ფერმენტს წარმოადგენს, რომელიც ციტრატს გარდაქმნის იზოციტრატად. ფერმენტს გააჩნია რკინა-გოგირდოვანი ჯგუფები, რაც განაპირობებს მის მგრძნობელობას აქტიური რადიკალების მიმართ. არსებობს ამ ფერმენტის მიტოქონდრიული და ციტოზოლური ფორმები, რომლებსაც შეუძლათ მიიღონ მონაწილეობა რკინის მეტაბოლიზმშიც, ვინაიდან რკინის დეფიციტისას იძენენ რკინაზე პასუხისმგებელი ცილის ფუნქციას და ჩართული არიან რკინის მეტაბოლიზმში მონაწილე ცილების ტრანსლაციის რეგულირებაში. აკონიტაზები არის რეაქტიული ჟანგბადისა და აზოტის ისეთი სახეობების ძირითადი სამიზნეები, როგორიცაა სუპეროქსიდის რადიკალი (O2•-), წყალბადის ზეჟანგი (H2O2), აზოტის ოქსიდი (•NO) და პეროქსინიტრიტი (ONOO-). ამ თავისუფალ რადიკალებს შეუძლიათ რკინის დაჟანგვა შესაბამისად, აკონიტაზას კატალიზური აქტივობის დაკარგვას. ეს ფერმენტები, როგორც რედოქს- სენსორები უჯრედის სხვადასხვა ნაწილში,

არეგულირებს ციტრატის კონცენტრაციას და მის გადინებას მიტოქონდრიიდან, ასევე რკინის ხელმისაწვდომობას ციტოზოლში და უჯრედული ჟანგვის წარმოება [44].

სუქცინატდეჰიდროგენაზა მიტოქონდრიის შიდა მემბრანასთანაა ასოცირებული ფერმენტულ კომპლექსია, რომელიც მონაწილეობს ლიმონმჟავა ციკლში, კერძოდ მისი მეშვეობით ხორციელდება სუქცინატის დეჰიდრირება, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ფუმარატი (ფუმარის მჟავა). ფერმენტის პროსთეტულ ჯგუფს წარმოადგენს დაჟანგული FAD^+ , რომელიც რეაქციის მსვლელობისას იკავშირებს წყალბადის ორ ატომს, რასაც მოსდევს მის აღდგება FADH2–მდე. ფერმენტი აღმოჩენილია ბევრ აერობულ და ანაერობულ ორგანიზმში. წარმოქმნილი ფუმარატი ფუმარაზას მონაწილეობით განიცდის გარდაქმნას მალატად ანუ ვაშლის მჟავად. აღსანიშნავია, რომ ეს პროცესი მიმდინარეობს მიტოქონდრიებში მიტოქონდრიული იზოფორმის მიერ, ვინაიდან არსებობს ამ უკანასკნელის ციტოზოლური იზოფორმაც, რომელიც ძირითადად ამინომჟავების მეტაბოლიზმში იღებს მონაწილეობას. ასევე აღსანიშნავია მისი მონაწილეობა სიმსივნურ პროცესებში. იგი ითვლება სიმსივნის სუპრესორად იწვევს რა კიბოს განვითარებაში ეპიგენეტიკური და მეტაბოლური ცვლილებების ინდუქცის და გამოიყენება სუქცინატთან ერთად კიბოს სადიაგნოსტიკო მარკერად [34].

ფუმარაზა აკატალიზებს ფუმარატის გარდაქმნას L- მალატამდე, გვხვდება მიტოქონდრიაში და მონაწილეობს კრებსის ციკლში. მიტოქონდრიული იზოფორმის გარდა, ცნობილია მისი ციტოზოლური ფორმაც და კოდირებულია FUM1 გენით. ციტოზოლური ფუმარაზას ფერმენტული აქტივობა მნიშვნელოვანია დნმ-ის დაზიანების საპასუხო რეაქციისთვის. აღმოჩნდა, რომ ფერმენტი მონაწილეობს უჯრედულ პასუხში დნმ-ის ორჯაჭვიანი რღვევის დროს. გასაოცარია, რომ დნმ-ის დაზიანებისას ცილა ტრანსპორტირდება ციტოზოლიდან ბირთვში, სადაც ფერმენტული აქტივობის წყალობით მონაწილეობს დნმ-ის დაზიანების პასუხში. თავად ფუმარაზა ფოსფორილირდება დნმ-დამოკიდებული პროტეინ კინაზათი [78; 134].

α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზა არის ფერმენტი, რომელიც ჩართულია კრებსის ციკლში და ახდენს α-კეტოგლუტარატიდან სუქცინილ-coA-ს სინთეზს. ამ რეაქციის შედეგად აღდგება $NADH_2$, რომელიც წყალბადის ატომებს აწვდის სუნთქვის

ჯაჭვს. ჰექსოკინაზა აწარმოებს ჰექსოზების ფოსფორილირებას და მისი ყველაზე ხშირი სუბსტრატი არის გლუკოზა. რეაქციის შედეგად წარმოიქმნება გლუკოზო-6-ფოსფატი. აღსანიშნავია, რომ იგი წარმოადგენს ოქსიდაციური სტრესის სამიზნეს, მგრძნობიარეა რა რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) მიმართ და ამ ფერმენტის დათრგუნვა შეიძლება იყოს კრიტიკული ოქსიდაციური სტრესით გამოწვეული მეტაბოლური დეფიციტის დროს [81; 119].

I.5 PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტები

მრავალუჯრედული ორგანიზმები მოიცავს უჯრედების მოწესრიგებულ და კონტროლირებად ერთობლიობას. ასეთი მრავალუჯრედიანი ორგანიზმების შენარჩუნება დამოკიდებულია არა მხოლოდ მატერიალურ და ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე, არამედ უჯრედშორის კომუნიკაციასა და სიგნალის რეგულირებაზე. PI3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს სიგნალის გადაცემის და ისეთი ბიოლოგიური პროცესების რეგულირებაში, როგორიცაა უჯრედების პროლიფერაცია, აპოპტოზი, მეტაბოლიზმი და ა.შ. ამ სასიგნალო გზის მარეგულირებელი მექანიზმები და ბიოლოგიური ფუნქციები მნიშვნელოვანია ადამიანის მრავალი დაავადების, მათ შორის ტვინის იშემიური დაზიანების, ნეიროდეგენერაციული დაავადებების და სიმსივნეების დროს.

PI3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზა წარმოადგენს მნიშვნელოვან კასკადს, რომელიც შედგება ორი ნაწილისგან: ფოსფატიდილინოზიტოლის 3-კინაზა (PI3K) და სერინ/ტრეონინ პროტეინ კინაზა B (PKB; ასევე ცნობილი როგორც AKT). PI3K/AKT/mTOR გზა სტიმულირდება ციტოკინის რეცეპტორების გააქტიურებით. ცილა PI3K-ს აქტივაცია(ფოსფოინოზიტოლ-3 კინაზა) იწვევს პლაზმურ მემბრანაში ლოკალიზებული ცილა Akt-ს ფოსფორილირებას, რითაც ხელს უწყობს mTOR-ის აქტივაციას, რომელიც თავის მხრივ ასტიმულირებს ისეთ პროცესებს, როგორცაა გლუკოზის მეტაბოლიზმი, აპოპტოზი, უჯრედების პროლიფერაცია და მიგრაცია. ფოსფორილირებული ცილა mTOR - ასევე იწვევს უჯრედული ტრანსკრიფციის ფაქტორების აქტივაციას, რაც შესაბამისად ასტიმულირებს გარკვეული ცილების სინთეზის ინტენსიფიკაციას. დღეისათვის საკმაოდ ბევრი ნივთირებაა ცნობილი,

რომლებიც იწვევენ PI3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზის გააქტიურებას, ასეთებია მაგალითად ინსულინი, ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი (IGF-1), ზოგიერთი ამინომჟავა და მათ შორისაა კრეატინიც, როგორც ბიოგენური ამინი. ზოგიერთი ტიპის სიმსივნეების დროს ნანახია PI3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტების რაოდენობრივი მატება, ვინაიდან ეს სასიგნალო გზა ხელს უშლის აპოპტოზს და ასტიმულირებს უჯრედების პროლიფერაციას. ასევე ამ გზის დისფუნქცია დაკავშირებულია ადამიანის ისეთ დაავადებებთან, როგორიცაა ლეიკემია, დიაბეტი და შიზოფრენია [132; 38;].

PI3K-ფოსფატიდილ ინოზიტოლ-3 კინაზა. ფოსფატიდილ ინოზიტოლ-3 კინაზა მიეკუთვნება PI3K ცილების ოჯახს, რომელშიც გაერთიანებულია პროტეინკინაზების ოთხი განსხვავებული კლასი. მათი ძირითადი დანიშნულება სხვა პროტეინკინაზების მსგავსად, ბიომოლეკულების ფოსფორილირებაში მდგომარეობს. PI3K ოჯახის ცილების წარმომადგენლები ასევე მონაწილეობენ ფოსფატიდილინოზიტოლ- 4,5-დიფოსფატის(PIP2) გარდაქმნაში ფოსფატიდილინოზიტოლ-3,4,5- ტრიფოსფატა-დ(PIP3), რომელიც მემბრანული ფოსფოლიპიდია და ფერმენტ ფოსფოლიპაზა C-ს მიერ განიცდის დაშლას მეორადი მესენჯერების წარმოქმნით, რაც თავის მხრივ იწვევს Akt-ს აქტივაციას. ისინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ უჯრედების ზრდაში, დიფერენციაციაში, გლუკოზის ტრანსპორტსა და მეტაბოლიზმში. PI3K შედგება მარეგულირებელი (p85α, p85β და p85γ) და კატალიზური (p110α, p110β, p110δ, და p110γ) სუბერთეულებისაგან; p110α და p110β ფართოდ არის გამოხატული ბევრში ქსოვილებში, ხოლო p110δ და p110γ ძირითადად გვხვდება ლეიკოციტებში [38; 132; 112].

AKT -პროტეინ კინაზა B. სერინ/ტრეონინ პროტეინ კინაზა (AKT) მოიცავს სამ ქვეტიპს, AKT1, AKT2 და AKT3. AKT1 ფართოდ არის წარმოდგენილი სხვადასხვა ქსოვილში, AKT2 ა ძირითადად ინსულინისადმი მგრძნობიარე ქსოვილებში გვხვდება, ხოლო AKT3 ტვინში და სათესლე ჯირკვლებში. სამივე ქვეტიპის ამინომჟავების შემცველობა 85%-ით ჰომოლოგიურია და შედგება სამი განსხვავებული ფუნქციური დომენისაგან. N-ტერმინალური დომენი არეგულირებს ცილა-ცილაოვან და ცილი ლიპიდურ ურთიერთქმედებას, ცენტრალური კატალიზური დომენი პასუხისმგებელია ფერმენტული აქტივობაზე, გარდა ამისა, ამინომჟავა Tr308,

რომლის ფორსფორილირებაც ხორციელდება, მდებარეობს ამ დომენში და აუცილებელია AKT-სთვის გააქტიურებიოსთვის. C-ტერმინალის დაბოლოება კი მარეგულირებელი დომენს წარმოადგენს. AKT რეგულირდება სხვადასხვა ჰორმონებით, მათ შორის ინსულინითა და ზრდის ფაქტორებით [87; 112; 132].

PKB სასიცოცხლო ფუნციას ასრულებს ფოსფატიდილინოზიტოლ3-კინაზას (PI3K) შუამავლობით გამოწვეულ ონკოგენეზში სხვადასხვა ავთვისებიან სიმსივნეებში და წარმოადგენს კიბოს წამლების ერთ-ერთ სამიზნეს. PKB იზოფორმები მნიშვნეელოვან როლს ასრულებენ სიმსივნური პროცესების დროს უჯრედული ინვაზიისა და ამ უჯრედების მიგრაციის რეგულირებაში. ასევე აღსანიშნავია, რომ ავთვისებიანი ტრანსფორმაციისა და კიბოს პროგრესირების დროს მაღალი სიხშირით შეიმჩნევა გენეტიკური ცვლილებები, რომლებიც განაპირობებს პროტეინკინაზას B (Akt) არასწორ აქტივაციას. ხშირია იმ გენის მუტაციებიც, რომლებიც კოდირებენ ამ სასიგანლო გზის რეგულატორებს ან Akt-ს, მაგ., ზრდის ფაქტორის რეცეპტორებს, RAS და ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზას (PI3K), ან Akt სამი იზოფორმიდან ერთ-ერთს, აგრეთვე სიმსივნის სუპრესორ ფოსფატაზას. Akt-ის გააქტიურებით, ეს გენეტიკური ცვლილებები არა მხოლოდ ხელს უწყობს კიბოს უჯრედების ზრდას, პროლიფერაციას და ავთვისებიან ქცევას სხვადასხვა სასიგნალო მოლეკულების ფოსფორილირებით, არამედ ასევე შეუძლია ხელი შეუწყოს ქიმიო- და რადიორეზისტენტობას სიმსივნეების მრავალ ტიპში [112; 122].

ცნობილია, რომ Akt-ს უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს PTEN, რომელიც მონაწილეობა Akt-ს დეფოსფორილირებაში და იწვევს რა მისი აქტივობის შემცირებას, ითვლება სიმსივნის სუპრესორ ცილად. PTEN აკატალიზებს PIP3-ის წარმოქმნის საპირისპირო რეაქციას.

mTOR. სერინ/ტრეონინ კინაზური აქტივობის მქონე კიდევ ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ცილას წარმოადგენს mTOR, რომელიც მოიცავს mTOR კომპლექს 1-ს (mTORC1) და mTOR კომპლექსი 2-ს (mTORC2). mTORC1, რომელიც შედგება mTOR, Raptor და mLST8-ისგან, ძირითადად არეგულირებს უჯრედების ზრდას და ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმს და მგრძნობიარეა რაპამიცინის მიმართ. mTORC2, რომელიც შედგება mTOR, Rictor, Sin1 და mLST1 ცილებისაგან, ძირითადად მონაწილეობს ციტოჩონჩხის რეკონსტრუქციაში და უჯრედების გადარჩენაში და არ

არის მგრძნობიარე რაპამიცინის მიმართ [45; 85]. mTORC1 აქტიურდება ფოსფორილირებული AKT-ით, ხოლო mTORC2-ს ააქტივებს AKT, რომელიც, თავის მხრივ, ამინომჟავა Ser473-ის ფოსფორილირებით აქტიურდება. TSC1–TSC2 სასიგნალო გზას ასევე შეუძლია mTOR-ის რეგულირება, შესაბამისად, უჯრედების ზრდა და პროლიფერაცია. TSC2 აქვს GTP-აზური აქტივობა და აინჰიბირებს Rheb-ს, რაც თავის მხრივ, აუცილებელია mTORC1 აქტივაციისთვის [59]. mTOR-ის სასიგნალო გზა მოიცავს სხვა მნიშვნელოვან ცილებსაც, მაგალითად 4EBP1-სა და S6K-ს. ეუკარიოტული ტრანსლაციის ინიციაციის ფაქტორის დამაკავშირებელი ცილის 4E-BP1-ს ფოსფორილირება mTOR-ის მიერ ამცირებს მის დაკავშირების უნარს ეუკატიოტულ ტრანსლაციის ინიციაციის ფაქტორთან eIF4E-თან, რის გამოც იწყება ტრანსლაციის ინიციაციის პროცესი გააქტიურებას. ნორმალურ უჯრედებში, mTOR-ის ინჰიბირება ამცირებს უჯრედულ ATP დონეს. S6K არის კიდევ ერთი სამიზნე mTOR-ის სასიგნალო გზაზე, რომელიც კოდირებულია ორი უჯრედული გენით: S6K1 და S6K2 [86; 133]. სხვადასხვა კვლევამ აჩვენა, რომ S6K1-ს შეუძლია გავლენა მოახდინოს უჯრედების ზრდასა და პროლიფერაციაზე mRNA-ების ტრანსლაციის ხელშეწყობის გზით . S6K1-ს შეუძლია უშუალოდ მოახდინოს შესაბამისი კომპონენტების და ფაქტორების ფოსფორილირება, მათ შორისაა რიბოსომური ცილა S6, eIF4B და PDCD4 [86]. კვლევებმა ასევე აჩვენა, რომ mTORC1-ს შეუძლია SREBP1-ის გააქტიურება S6K1-ის მეშვეობით [133]. გარდა ამისა, mTOR-ის გადაჭარბებული გააქტიურება აძლიერებს ლიპიდების ანაბოლიზმს თაგვებში სიმსუქნისა და დიაბეტის დროს [138].

I.6 კრეატინი

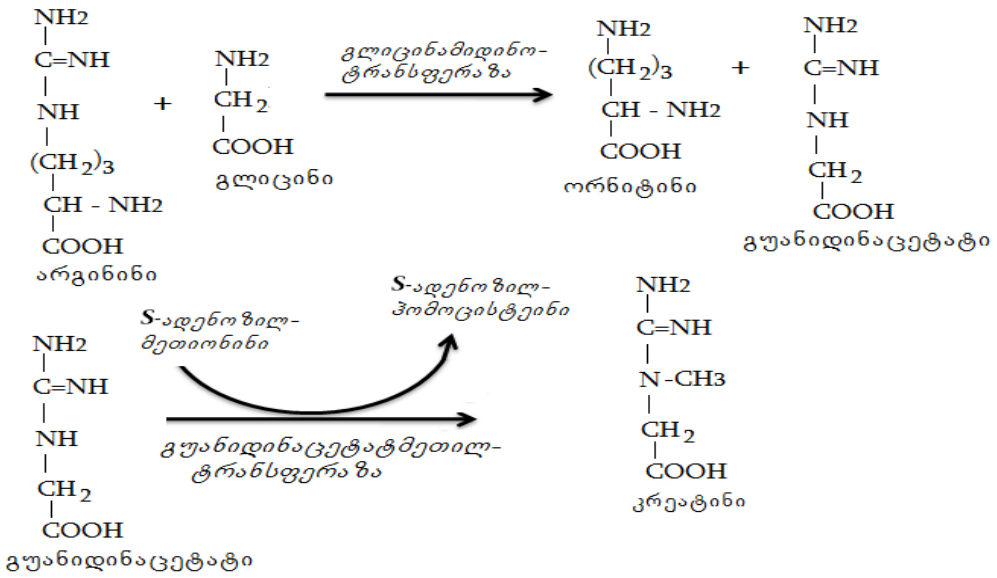
კრეატინი წარმოადგენს ნიტროგენულ ორგანულ მჟავას, რომელიც არგინინის, გლიცინისა და მეთიონინისგან მიიღება. იგი ძირითადად ღვიძლში, პანკრეასსა და თირკმელში სინთეზირდება და შემდეგ სისხლის მიმოქცევის სისტემის მეშვეობით ტვინს, გულს, კუნთს და სხვა ორგანოებს მიეწოდება. კრეატინის უჯრედში შეღწევა აქტიური სატრანსპორტო მექანიზმის საშუალებითაა შესაძლებელი და ამ პროცესს აწარმებს სპეციალური სატრანსპორტო ცილა - კრეატინის ტრანსპორტერი (შემოკლებით CrT). კრეატინის, როგორც დანამატის გამოყენება ეფუძნება ჩონჩხის

კუნთებში კრეატინის რეზერვის გაზრდის შესაძლებლობას. კრეატინ-ფოსფატური სისტემა (ფოსფოკრეატინი) განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი კომპონენტია ენერგეტიკულ მეტაბოლოზმში, რაც ხოციელდება კრეატინფოსფატის მოლეკულის (CrP) ჰიდროლიზით წყლისა და თავისუფალ კრეატინის (Cr) გამოყოფით, სადაც გამოიყოფა არაორგანული ფოსფატების ჯგუფები (Pi), რომელიც დაუკავშირდება ადენოზინ დიფოსფატს (ADP) და წარმოქმნას ადენოზინტრიფოსფატს [18; 27].

ენერგეტიკული ფუნქციის გარდა, Cr სავარაუდოდ სხვა ფუნქციებსაც ასრულებს, მათ შორისაა ნერვული იმპულსის გადაცემა, მემბრანული პოტენციალისა და იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედშიდა სიგნალების გადაცემა, აქსონალური და დენდრიტული ტრანსპორტი და ა.შ. ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, კრეატინი ასევე შესაძლებელია განიხილული იქნას როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლაა მოახდინოს ზოგიერთი პოსტსინაფსური რეცეპტორების მოდულირება. მიღებულია მონაცემები, რომლებიც მიუთითებს Cr-ის მნიშვნელობას ფსიქომოტორული განვითარებისა და შემეცნებითი ფუნქციების რეალიზირების და ემბრიონულ განვითარების პროცესშიც. მისი დეფიციტი ცნს-ში უარყოფითად აისახება ტვინის ფუნქციონირებაზე და ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების თანხვედრ მოვლენას წარმოადგენს. ანალოგიური თვისებები ახასიათებს Cr-ს ზოგიერთი ფსიქიატრიული დაავადებების, მაგალითად, ეპილეფსიის, შიზოფრენიის, ფსიქოლოგიური სტრესის მიმართაც [70; 120] .

ითვლებოდა, რომ ტვინის Cr ძირითადად პერიფერიული წარმოშობისაა. თუმცა მის სინთეზში მონაწილე ფერმენტების L-არგინინი: გლიცინ-ამიდინოტრანფერაზას (AGAT) და გუანიდინოაცეტატმეთილტრანსფერაზას (GAMT) ცნს-ში არსებობა ადასტურებს, რომ ტვინს შეუძლია მოახდინოს Cr -ის ენდოგენური სინთეზი. კრეატინის სპეციფიკური ტრანსპორტერი SLC6A8 საშუალებას იძლევა მოხდეს მისი იმპორტი ჰემატოენცეფალური ბარიერის (BBB) გავლითაც [35]. Cr-ის რაოდენობრივ შემცველობაზე გავლენას ახდენს სხვადასხვა ფაქტორები, კერძოდ, თავის ტვინის ფუნქციური მდგომარეობა, ნეიროდეგენერაციული პროცესები, ოქსიდაციური სტრესი და მისი შედეგები და ასევე CK აქტივობა, რომლის ცვლილება შეინიშნება ცნს-ის მთელი რიგი დაავადებისას.

უჯრედში კრეატინის ბიოსინთეზი ორსაფეხურიანი პროცესია. რეაქციის პირველ საფეხურზე არგინინიდან ფერმენტ *L-არგინინ:გლიცინამიდინოტრანსფერაზის (AGAT)* მიერ ამინომჟავა გლიცინის ამიდინირება ხდება. რეაქციის შედეგად L-ორნიტინი და გუანიდინოაცეტატის მჟავა (GAA) მიიღება. ბიოსინთეზის მეორე და საბოლოო საფეხურზე GAA-ის მეთილირებით ფერმენტ *S-ადენოზილ-L-მეთიონინ-N-გუანიდინოაცეტატ:მეთილტრანსფერაზის (GAMT)* მონაწილეობით წარმოიქმნება კრეატინი [4; 19].



სურ.1 კრეატინის სინთეზის მიმდინარეობა უჯრედში

კრეატინის ნორმალურ მეტაბოლიზმს კრიტიკული მნიშვნელობა გააჩნია ცოცხალი სისტემის ნორმალური ფუნქციონირებისთვის. Cr/CK/PCr სისტემისა და კრეატინის მეტაბოლიზმის დარღვევები აღინიშნება ისეთი დაავადებების დროს როგორიცაა კუნთოვანი დისტროფია, ჰიპოქსიურ-იშემიური ენცეფალომიოპათია და სხვ.ზოგიერთ ამ დაავადებაზე კრეატინს მკვეთრად გამოხატული დამცველობით-პროფილაქტიკური ეფექტი ახასიათებს. ის წარმოადგენს მეტაბოლური სტრესით, გლუტამატის ტოქსიკურობითა და ჟანგვითი დაზიანებით გამოწვეული უჯრედების კვდომის თავიდან აცილების საკმაოდ ეფექტურ საშუალებას. თუმცა ამ პროცესის მიმდინარეობის ხასიათი დღემდე გაურკვეველია [101].

ბოლო პერიოდში სულ უფრო იზრდება ინტერესი ეგზოგენური კრეატინის (Cr) გამოყენების მიმართ, როგორც თერაპიული საშუალება ცხოვრების ხარისხის გასაუმჯობესებლად ისეთ პაციენებში, ვისაც აწუხებს დაღლილობის ნევროლოგიური

სიმპტომები და კუნთების სისუსტე. გაფანტული სკლეროზის მქონე ადამიანები (MS) ერთ-ერთი ასეთი ჯგუფია, რომლებმაც შეიძლება ისარგებლონ Cr- ის დამატებით, რადგან ცნობილია, რომ იგი იწვევს ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის გაძლიერებას და დაღლილობის შემცირებას [131]. გაფანტული სკლეროზი არის ნევროლოგიური დაავადება, რომელიც გავლენას ახდენს ცენტრალური ნერვული სისტემის თეთრ ნივთიერებაზე დემიელინიზაციის პროცესის დარღვევის საშუალებით, რამაც შეიძლება მნიშვნელოვნად შეზღუდოს კუნთების ფუნქციონირება. მრავალმა გამოკვლევამ აჩვენა, რომ MS- ს დროს აღინიშნება ჩონჩხის კუნთის ისეთი მეტაბოლური დარღვევები, როგორიცაა ვარჯიშის დროს ფოსფატის, pH- ის და PCr- ის მკვეთრი ცვლილებები, აგრეთვე შემცირებულია ჟანგვითი ფერმენტების კონცენტრაციები, მაგ. სუქცინატდეჰიდროგენაზასი. ამასთან, კრეატინის დამატებამ აჩვენა, რომ იგი ახდენს გენოპროტექტორულ მოქმედებას მიტოქონდრიულ დნმ-ზე. ამ ეფექტის ჰიპოთეზა არის ის, რომ კრეატინი მონაწილეობს მიტოქონდრიებში ფუნქციური შედეგების შენარჩუნებაში, როგორიცაა ჟანგბადის მოხმარება, ATP– ს შემცველობა და უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა [46].

I.7 სტრესი და მისი კრეატინით პრევენცია

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

იმპულსის გადაცემა სინაფსებში, იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედშიდა სიგნალების გადაცემა და სხვა.

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

კრეატინის ანტიოქსიდანტური თვისებები შერჩევითია, რადგან იგი მოქმედებს სუპეროქსიდზე და ჟანგბადის აქტიურ რადიკალებზე, ამის საპირისპიროდ, კრეატინს არ შეუძლია წყალბადის ზეჟანგისა და t-ბუთილ ჰიდროპეროქსიდის არარადიკალური ჟანგვის წყაროების განადგურება, თუმცა ეფექტურია ჟანგვითი სტრესის მიმართ. ყველა აუცილებელი ამინომჟავა იჟანგება მეტაბოლიზმში და ბევრი ასევე განსაკუთრებით მგრძნობიარეა თავისუფალი რადიკალებისა და რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების მიმართ. მაგალითად, არგინინს, კრეატინის წარმომქმნელ სუბსტრატს შეუძლია გაანადგუროს ქსანტინოქსიდაზას საშუალებით წარმოქმნილი O2 •, ხელი შეუშალოს სპილენძით გამოწვეულ ლიპოპროტეინების დაჟანგვას, და ენდოთელური უჯრედების და აორტის მიერ O_2 • -ის გამოყოფას [27; 70; 120].

კრეატინის უნარი გააუმჯობესოს ანტიოქსიდანტური ეფექტი ვლინდება იმაშიც, რომ მის წინამორბედ არგინინს გააჩნია დამცველობითი როლი ენდოთელურ უჯრედებში მიმდინარე ოქსიდაციური სტრესის დროს ლიპოპროტეინების დაჟანგვის პროცესში. ასევე დამატებითი მონაცემები გვიჩვენებს, რომ არგინინს შეუძლია დათრგუნოს თავისუფალი რადიკალები. არსებობს ჰიპოთეზაც, რომ კრეატინმა და არგინინმა შეიძლება გააუმჯობესოს კარდიოვასკულარული დაავადებების მკურნალობა, თუმცა ეს მოსაზრება ჯერ კიდევ არ არის შესწავლილი და შესაძლოა მომავალში შესწავლის საკითხი გახდეს. ასევე შესაძლებელია კრეატინმა იმოქმედოს არაპირდაპირი გზით ანტიოქსიდანტური ფუნქციის ასამაღლებლად. მაგალითად, თუ კუნთოვანი უჯრედებში კრეატინის დონე გაიზარდა, მაშინ ნაკლები არგინინი

იქნებოდა საჭირო ენერგიის მეტაბოლიზმისთვის და აზოტის ოქსიდის გამომუშავებისთვის [83].

მეცნიერებმა კრეატინის პოტენციური ანტიოქსიდანტური ეფექტი განსაზღვრეს სხვადასხვა უჯრედული კულტურის შტამებზე, მაგალითად, ადამიანის პრომონოციტში, ენდოთელურ უჯრედებში და კუნთოვან მიობლასტომაში. დაკვირვება ხდებოდა ციტოტოქსიური ეფექტის გამოწვევ ოქსიდანტური აგენტებით. შედეგებით დადგინდა, რომ უჯრედული დაცვა დაკავშირებული იყო უჯრედშიდა თავისუფალი კრეატინის შემცველობასთან.

ასევე შესწავლილია კრეატინის ანტიოქსიდანტური ეფექტი მუტაგენეზთან მიმართებაში. დაადგინდა, რომ კრეატინის დამატებამ გამოავლინა სპეციფიკური გენოპროტექტორული აქტივობა მიტოქონდრიულ დნმ-ში და უზრუნველყოფო გენომის სტაბილურობა. კრეატინს ასევე შეუძლია მონაწილეობა მიიღოს ისეთი მიტოქონდრიული ფუნქციების შენარჩუნებაში, როგორიცაა ჟანგბადის მოხმარება, ატფ-ს გენერაცია და საბოლოოდ, უჯრედის გადარჩენა.

არსებობს რამდენიმე კვლევა, სადაც შეემოწმებული იქნაა კრეატინის ეს ეფექტი იმ შემთხვევაში, როცა მოქმედებს სტრეს-ფაქტორი, რომელიც ზრდის ოქსიდანტური აგენტების წარმოქმნას. დაადგენილი იქნა, რომ კრეატინის დამატებამ შეძლო შეემცირებინა ოქსიდაციური სტრესის მარკერები პლაზმასა და კუნთში.

აღმოჩნდა, რომ კრეატინის დამატებამ კუნთების დისტროფიის მქონე პაციენტებში, რომლებსაც აღენიშნებათ ცილის სინთეზისა და ზრდის შემცირება ჩონჩხის მიოფიბრილების დეგრადაციის გამო, გაზარდა ხელის მოჭერის ძალა და სხეულის მასა. თუმცა არსებობს მოსაზრებაც, რომ ჩონჩხის კუნთების მიერ კრეატინის შეწოვა საკმარისად არ ხდება, რაც ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზეც აისახება.

კრეატინი დადებით ეფექტს ახდენს ნეირომუსკულატორული და ნეიროდეგენერაციული დაავადების მიმდინარობაზე. იგი ასევე გამოიყენება ართრიტისა და დეპრესიის მკურნალობაში. ექსპერიმენტებში პარკინსონით დაავადებულ ვირთაგვებში ეგზოგენურად შეყვანილი კოენზიმი Q და კრეატინის კომბინაცია იცავს ნეირონებს დაზიანებისაგან. ალცჰაიმერის დაავადების შემთხვევაში კრეატინი იცავს ჰიპოკამპის ნეირონებს ბეტა-ამილოიდის ტოქსიკური ეფექტისგან და შესაბამისად ამცირებს ამილოიდური ფოლაქების წარმოქმნას. ამიოტროფული

სკლეროზის დროს კრეატინის დადებითი ეფექტი ვლინდება ოქსიდაციური სტრესის შემცირებაში. კლინიკური ცდები ადასტურებს, რომ კრეატინის მოხმარებით იზრდება კუნთების სიმტიცე და ძალა, კლებულობს დაღლილობის შეგრძნება. ჰანტინგტონის დაავადებისას კრეატინი აქვეითებს ლაქტატის დონეს, აუმჯობესებს სხეულის წონას , მოტორულ ფუნქციებს და აფერხებს ტვინში მიმდინარე ატროფიულ პროცესებს [8; 64; 83].

I.8 NMDA რეცეპტორი და Na+/K+-ATP-აზა-ს სტრუქტურა

N-მეთილ-D-ასპარტატის რეცეპტორი (NMDAR) ქმნის ჰეტეროდიმერს მინიმუმ ერთი NR1 სუბერთეულისა და ერთი NR2A-D ქვესუბერთეულებისგან. რეცეპტორის იზოფორმები, თავის ტვინში მკაფიო განაწილებითა და ფუნქციური თვისებებით, წარმოიქმნება NR1 ტრანსკრიპტების შერჩევითი შერწყმისა და NR2 ქვესუბერთეულების დიფერენციალური დაკავშირების შედეგად. NR1 სუბერთეული უკავშირდება გლიცინს, ხოლო NR2 სუბერთეული ურთიერთქმედებს ნეიროტრანსმიტერ გლუტამატთან. NMDA რეცეპტორის გააქტიურება იონური არხის გახსნის საშუალებას იძლევა, რათა მოხდეს Na+ და Ca2+ იონების შემოდინება უჯრედში, ხოლო K+ გასვლა უჯრედიდან. თითოეულ სუბერთეულს აქვს ციტოპლაზმური დომენი, რომელიც შეიძლება პირდაპირ შეიცვალოს პროტეინკინაზა/ფოსფატაზას მიერ. PKC-ს შეუძლია რეცეპტორის NR1 ქვესუბერთეულის (NMDAR1) ფოსფორილირება Ser890/Ser896-ზე და PKA-ს შეუძლია NR1-ის ფოსფორილირება Ser897-ზე. NR1-ის ფოსფორილირება PKC-ით ამცირებს მის აფინურობას კალმოდულინთან, რითაც ხელს უშლის კალმოდულინის ინჰიბიტორულ ეფექტს ამ რეცეპტორზე. PKA-ს მიერ NR1-ის ფოსფორილირება, სავარაუდოდ, ეწინააღმდეგება კალცინეურინის ინჰიბიტორულ ეფექტს რეცეპტორებზე. NMDAR შუამავლობს ხანგრძლივ პოტენციაციას და ნელ პოსტსინაფსურ აგზნებას შორის, რომელიც ცენტრალურ როლს ასრულებს დასწავლასა და ნეიროპლასტიურობაში [28, 68].

ცნობილია, რომ ადრენალინის დაკავშირება EphB რეცეპტორთან იწვევს Src ოჯახის თიროზინ კინაზების გააქტიურებას, რომლებიც აფოსფორილირებენ NMDAR2B-ს Tyr1252, Tyr1336 და Tyr1472-ზე. თავის მხრივ, ფოსფორილირებული

NMDAR2B აძლიერებს NMDA რეცეპტორის უნარს, დაარეგულიროს Ca2+ შემოდინება გლუტამატის საპასუხოდ. NMDAR2A-ს ფოსფორილირება Tyr1246-ზე დაფიქსირდა იშემიური ვირთაგვას ტვინიდან იზოლირებულ ექსტრაქტებში[94] .

ლიტერატური მონაცემებით დადგენილია, რომ NMDA რეცეპტორსა და Na+/K+-ATP-აზა-ს შორის არსებობს ფუნქციური და სტრუქტურული ურთიერთკავშირი. Na,K-ATPაზა არის ინტეგრალური მემბრანული ჰეტეროდიმერი, რომელიც მიეკუთვნება P-ტიპის ATP-აზების ოჯახს. ეს იონური არხი იყენებს ATP ჰიდროლიზისგან მიღებულ ენერგიას მემბრანის პოტენციალის შესანარჩუნებლად ნატრიუმის ექსპორტისა და კალიუმის იმპორტის მეშვეობით პლაზმურ მემბრანაში მათი ელექტროქიმიური გრადიენტების საწინააღმდეგოდ. იგი შედგება კატალიზური α სუბერთეულისაგან და β სუბერთეულისაგან. იდენტიფიცირებულია ფოსფორილირების რამდენიმე ადგილი α1 სუბერთეულისთვის. Tyr10 ფოსფორილირდება ჯერ კიდევ განუსაზღვრელი კინაზათ, Ser16 და Ser23 ფოსფორილირდება PKC-ით, ხოლო Ser943 ფოსფორილირდება PKA-ით. ცვლის Na,K-ATPაზას კინეტიკურ თვისებებს, ყველა ეს ადგილი ჩართულია ფერმენტების აქტივობის რეგულირებაში ჰორმონებისა და ნეიროტრანსმიტერების საპასუხოდ,. ანგიოტენზინ II-ის საპასუხოდ შეცვლილი ფოსფორილირება ასტიმულირებს აქტივობას ვირთხების პროქსიმალურ მილაკებში. Na, K-ATPაზა ასევე მონაწილეობს სიგნალის გადაცემის სხვა გზებში. ინსულინი არეგულირებს მის ლოკალიზაციას დიფერენცირებულ პირველადი ადამიანის ჩონჩხის კუნთების უჯრედებში და ეს რეგულაცია დამოკიდებულია ERK1/2(extracellular signal-regulated protein kinase) მიერ α სუბერთეულის ფოსფორილირებაზე. Na, K-ATP-აზა და Src ქმნიან სასიგნალო რეცეპტორების კომპლექსს, რომელიც გავლენას ახდენს Src კინაზას აქტივობის რეგულირებაზე და, შემდგომში, მის ქვედა ეფექტორებზე [26; 58].

I.9 ცირკადული რიტმი და საათის გენები

ცირკადული რიტმი არის გადამწყვეტი მექანიზმი, რომელიც უზრუნველყოფს გარემოს ყოველდღიურ ცვლილებებთან ადაპტაციის საშუალებას და ორგანიზმს საშუალებას აძლევს შეასრულონ ისეთი მნიშვნელოვანი ფუნქციები, როგორიცაა

ძილი, მეტაბოლიზმი, იმუნური ფუნქცია, ქსოვილების რეგენერაცია, მეხსიერების ფორმირება, დიფერენციაცია, ჰორმონის სეკრეცია, არტერიული წნევის კონტროლი, სხეულის ტემპერატურა და სხვ. [118]. ცნობილია, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის განხორციელებას განაპირობებს სპეციფიკური გენები, რომელთა მიერ კოდირებული ცილები წარმოადგენენ ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს და დიდწილად განსაზღვრავენ უჯრედული მეტაბოლიზმისათვის დამახასიათებელ ცირკადულ პროცესებს. ამ ცილების მოქმედების მექანიზმი დამყარებულია უჯრედისათვის დამახასითებელი სასიგნალო რეგულაციურ გზებზე ზემოქმედებით. ასეთ ცილებს განეკუთნება ე.წ. საათის გენებით კოდირებული Bmal1, Cry, Per1, Per2, Clock. ცნობილია, რომ BMAL1 და CLOCK ახორციელებს PER და CRY-ცილების გენების ტრანსკრიპციას, კერძოდ ქმნიან ჰეტეროდიმერს და უკავშირდებიან დნმ-ს იმ უბანს, რომელსაც შეუძლია ტრანსკრიფციის ფაქტორების დაკავშირება და პასუხისმგებელია per და cry გენების ექსპრესიაზე. ცნობილია, რომ საათის გენების პროდუქტებს გააჩნიათ PAS-დომენი და გავლენას ახდენენ ნიკოტინამიდფოსფოტრანსფერაზას გენის აქტივობაზე. თავად ამ ფერმენტის მოქმედება აძლიერებს ჟანგვა-აღდგენით რეაქციებს NAD^+ -ის წარმოქმნის გააქტივებით და ხელს უწყობს უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკული პროცესების ზრდას. NAD^+ -ის რაოდენობის ზრდა ააქტიურებს სირტუინ-1-ს, რომელიც აწარმოებს ისეთი ცილების დეაციტილირებას როგორიცაა Bmal1, Per2, Clock-ცილები. როგორც ცნობილა სირტუინები ს ოჯახი წარმოადგენს NAD-დამოკიდებულ ცილებს, რომელთაც გააჩნიათ დეაცეტილაზური ან ADP-რიბოზილტრანსფერაზული აქტიობა [121;].

აღსანიშნავია, რომ CRY უკავშირდება CLOCK-BMAL1-ს დნმ-ზე, რათა იწვევს CLOCK-BMAL1 შუამავლობით ტრანსკრიპციული რეპრესია, ხოლო PER შლის CLOCK-BMAL1-ს დნმ-დან CRY-დამოკიდებული გზით CLOCK-BMAL1-ის ეფექტის თავიდან ასაცილებლად. NR1D - ბირთვული რეცეპტორების სუპეროჯახი აკავშირებს Bmal1 და Cry1 გენის რეტინოინის მჟავას საპასუხო ელემენტს (RRE), რათა ჩაახშოს მათი ტრანსკრიფცია და ამით შეამციროს CLOCK-BMAL1 და CRY1 რაოდენობა. აღსანიშნავია, რომ საათის გენების მუტაციები განაპირობებს არა მხოლოდ დარღვევებს ცირკადულ პროცესებში, არამედ იწვევს ზრდის შეფერხებას, დაბერებას და უნაყოფობას [25].

თავი II. კვლევის ობიექტები და მეთოდები

II.1 კვლევის ობიექტი

ექსპერიმენტები ტარდებოდა მამრობითი სქესის, თეთრ, ლაბორატორიულ 45 ვირთაგვებზე, რომლებიც დაყოფილი იყვნენ სამ ჯგუფად (თვითოეულ ჯგუფში 15 ვირთაგვა). I ჯგუფს შეადგენდა საკონტროლო G1 ჯგუფის ვირთაგვები, რომლებიც მოთავსებულნი იყვნენ ერთად, საერთო გალიაში, ჩვეულებრივ პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 10.00/14.00სთ.). G2 ჯგუფის ინდივიდებს წარმოადგენდა ასევე 15 ვირთაგვა, რომლებიც სოციალური იზოლაციის მიზნით განთავსებული იყვნენ ინდივიდუალურ გალიებში, სიბნელის პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 23.5სთ/0.5სთ.). ცხოველები იმყოფებოდნენ სრულ მხედველობით იზოლაციაში. G3 ჯგუფის ინდივიდები, ასევე იმყოფებოდნენ სოციალურ იზოლაციასა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, თუმცა სტრესის პარალელურად, ინტრაპერიტონიალურად მიეწოდებოდათ 140მგ/კგ კრეატინი. არც ერთი ჯგუფისათვის ყნოსვა და სმენა შეზღუდული არ იყო. ცხოველებს საკვები და წყალი ეძლეოდათ შეუზღუდავად. ასეთ პირობებში ვირთაგვები იმყოფებოდნენ 30 დღის განმავლობაში, რის შემდგომაც სამივე ჯგუფის ვირთაგვებს ვაძინებდით ქლოროფორმით და ვახდენდით მათ დეკაპიტაციას.

II.2 ფიზიოლოგიური ტესტი „ღია ველის“ მეთოდი

საცდელ ცხოველთა ფიზიოლოგიური მდგომარეობის დადგენის ერთ–ერთი მეთოდია ე.წ. „ღია ველის“ ექსპერიმენტი, რომლის საშუალებითაც შესაძლებელია ცხოველთა მოტორული აქტივობისა და შიშის რეაქციების დადგენა რიგი ექსპერიმენტების გათვალისწინებით. „ღია ველის“ ცდა ტარდება წრიული ფორმის (d=1მ) მოედანზე, რომელსაც გააჩნია კედელი (h=75სმ) და ასევე გარემოდან

გამოყოფილია ფარდით, გარემო ფაქტორების ზეგავლენის შესამცირებლად ექსპერიმენტი უნდა ჩატარდეს იზოლირებულ, წყნარ ოთახში, ექსპერიმენტატორების მაქსიმალური რაოდენობა 2–3 ადამიანი.

აღნიშნული მოედანი დაყოფილია სექტორებად და ზონებად. ექსპერმენტატორი მოედნის ცენტრში ათავსებს საცდელ ცხოველს და 5 წუთის განმავლობაში ახორციელებს დაკვირვებას მის ქცევაზე. კერძოდ სპეციალურ ცხრილებში აღნიშნავს სხვადასხვა პარამეტრების არსებობას [57].

შიშის რეაქციები	
	დეფეკაცია
	გრუმინგის ხანგრძლივობა (წმ)
	გარინდვა
	გარინდვის ხანგრძლივობა
	ვერტიკალური დგომა
კვლევითი რეაქციები	ცენტრში ყოფნის ხანგრძლივობა (წმ)
	ცენტრში ყოფნის რაოდენობა
	ცენტრისკენული მოძრაობა
	ჰორიზონტალური მოძრაობები

II.3. ჰორმონების რაოდენობების განსაზღვრა

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

II.4. ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა

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

სუპერნატანტში ცის აკონიტის მჟავას გარდაქმნის პროდუქტს ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=240 ნმ) [65].

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

II.5. ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით ფერმენტის იმ რაოდენობის მიხედვით, რომელიც საჭიროა 1 წუთში 1 M ფუმარის მჟავას (ფუმარატი) დასასინთეზირებლად. მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვამუშავებდით ტრის-HCl-ის ბუფერით (pH=8.6), რომელიც შეიცავდა 30 mM კალიუმის ფოსფატს და 0.1 mM L-მალატს. ნარევს ვაყოვნებდით 15 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფუგებდით (3000 g x 10´). სუპერნატანტში ფუმარატის რაოდენობას

ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=240 ნმ) [140]. 41 ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა).

II.6. ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსასაზღვრავად ვიყენებდით აბესა და მატსუკის მოდიფიცირებულ მეთოდს.

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

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

შემდგომ ეტაპზე ვსაზღვრავდით მიღებული სუპერნატანტის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტროფოტომეტრულად (λ=540 ნმ) [88].

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

II.7. ფერმენტ ალდოლაზას აქტივობის განსაზღვრა

ადოლაზას აქტივობის განსასაზღვრავად ვიყენებდით ჩაპელისა და ჰოლმსის მოდიფიცირებულ მეთოდს [71].

ალდოლაზური აქტივობა ისაზღვრებოდა ტრიფოსფატებში არსებული ლაბილური ფოსფორის რაოდენობის მიხედვთ. საინკუბაციო ხსნარი შეიცავს 1 მლ

გლიცინის ბუფერს (0.1 M, pH 9.0), 0.25 მლ ფრუქტოზო–1,6–დიფოსფატის (2 mM) ხსნარს და 0.25 მლ ჰიდრაზინის ხსნარს (0.1 M). რეაქცია ჩერდება 2 M NaOH–ის დამატებით. ფერმენტის აქტივობა ისაზღვრება სპექტროფოტომეტრულად 340 ნმ ტალღის სიგრძეზე . 54 ფერმენტ ალდოლაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა).

II.8. ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით შუმანისა და სხვათა მოდიფიცირებული მეთოდით [141].

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

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

ფერმენტის აქტივობას ვითვლიდით შემდეგი ფორმულით: E = ΔA x 6508 μკატ./ლ 55 სადაც: E - ფერმენტის აქტივობაა, (A1+ A2+ A3) ΔA= - მიღებული შუქშთანთქმის სიდიდეთა საშუალო 3 ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა) .

II.9. მიტოქონდრიული ჰექსოკინაზას აქტივობა

მიტოქონდრიული ჰექსოკინაზას აქტივობა განისაზღვრა NADPH-ის წარმოქმნის თანმდევი შთანთქმის მიხედვით 340 ნმ-ზე. საინკუბაციო არე შეიცავდა 0.1-0.15მგ/მლ მიტოქონდრიულ ცილას, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, რომელიც შეიცავდა 0.1mM Ap5A-ს (ადენილატკინაზას ინჰიბიტორი), 5mM D-გლუკოზას, 10mM $MgCl_2^+$-ს, 1mM ატფ-ს, 1mM NADPდა 1 ერთეული/მლ გლუკოზა-6-ფოსფატდეჰიდროგენაზას (Leuconostocme senteroides). საინკუბაციო არეს მოცულობა შეადგენდა 1 მლ-ს. ოპტიკურ შთანქმას (OD) ვსაზღვრავდით 340 ნმ-ზე 2-5 წუთის განმავლობაში 30 წამიანი ინტერვალებით 25°C ტემპერატურის პირობებში [49; 140]. OD-ს მატება ასახავს NADPH - ის კონცენტრაციის მატებას. ჰექსოკინაზას აქტივობის გამოთვლას ვახდენდით მიღებული კინეტიკური მრუდის დახრის კუთხის მიხედვით.

რეაქტივები:

1. 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)
2. 0.1mM ადენილატკინაზას ინჰიბიტორი (Ap5A)
3. D-გლუკოზა
4. $MgCl_2$
5. ატფ
6. $^+NADP^+$
7. გლუკოზა-6-ფოსფატდეჰიდროგენაზა

II.10. სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის განსაზღვრა

მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის აღდგენის რეაქციის შებოჭვის ხარისხის განსაზღვრაში.

3 მლ საინკუბაციო არეს, რომელიც შეიცავდა ნიტროლურჯ ტეტრაზოლიუმს (0.41 mM), EDTA-ს (0.33 mM) და მეთილფენაზოლსულფატს (0.01 mM; pH=8.3), ვუმატებდით 0.02 მლ საკვლევ სუსპენზიას.

შემდგომ ეტაპზე ვსაზღვრავდით მიღებული ხსნარის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტოფოტომეტრულად (λ=540 ნმ), რის შემდეგაც ვუმატებდით 0.1 მლ ნადH-ის

ხსნარს (0.8 mM), ვურევდით და ვახდენდით ინკუბაციას 20´-ის განმავლობაში (t=37°C).

ინკუბაციის შემდეგ ვსაზღვრავდით ხსნარის შუქშთანთქმას სპექტროფოტომეტრულად (λ=540 ნმ).

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

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

$$A_{\text{აქტივობა}} = \frac{T\%}{100\% - T\%}$$

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

II.11. კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი დამყარებულია წყალბადის ზეჟანგის (H_2O_2) თვისებაზე, წარმოქმნას მოლიბდატის მარილებთან მყარი ფერადი კომპლექსი. ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე 0.1 მლ საკვლევ მასალას (100 მგქსოვილი/1 მლტრის-HCl (0.05 M), pH=7.8) ვუმატებდით 2 მლ წყალბადის ზეჟანგს (0.03%), ხოლო ბრმა ცდისთვის განკუთვნილ სინჯარაში საკვლევი მასალის ნაცვლად შეგვქონდა 0.1 მლ დისტილირებული წყალი. მიღებულ ნარევს ვაყოვნებდით 10 წუთი, რის შემდეგაც, ვახდენდით რეაქციის შეჩერებას 1 მლ ამონიუმის მოლიბდატის 4% -იანი ხსნარის დამატებით და წარმოქმნილ შეფერილობას ვსაზღვრავდით სპექტოფოტომეტრულად (λ=410 ნმ).

საკონტოლო სინჯარაში წყალბადის ზეჟანგის ნაცვლად შეგვქონდა 2 მლ დისტილირებული წყალი. ფერმენტის აქტივობას ვითლიდით ფორმულით:

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

სადაც:

E - ფერმენტის აქტივობაა
Aბრმა ცდა - შუქშთანთქმის სიდიდე ბრმა ცდისთვის

Aცდა -შუქშთანთქმის სიდიდე ცდისთვის
V - შეტანილი ნიმუშის მოცულობა (0.1 მლ)
t - ინკუბაციის დრო (10 წთ)
K - წყალბადის ზეჟანგის მილიმორალური კოეფიციენტი (22.2 x 10^3 mM-1 x cm^{-1}).

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

II.12. გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის განსაზღვრა

გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის განსასაზღვრავად გამოვიყენეთ კიტი(Glutathione Reductase Assay Kit, Sigma-Aldrich), რომლის რეაქტივებით სფექტროფოტომეტრულად ისაზღვრება გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობა. აღსანიშნავია, რომ შემდგომო აბსორბციის შემცირების მიზეზი არის NADPH-ს დაჟანგვა 340 ნმ ტალღის სიგრძეზე ან აბსორბციის გაზრდა განპირობებულია დითიობის (2-ნიტრობენზოლის მჟავა) გარდაქმნით 412 ნმ ტალღის სიგრძეზე (კოლორიმეტრული კიტი).

II.13. აზოტის ჟანგის რაოდენობის განსაზღვრა

NO-ის შემცველობას ჰიპოკამპის უჯრედებში განსაზღვრული იყო მირანდასა და სხვ. მეთოდი [11]. ამისათვის ჰიპოკამპის ჰომოგენატის ყოველ 100 µl ემატებოდა თანაბარი რაოდენობის 0.3 M-ის NaOH. მიღებულ ნარევს ვანჯღრევდით ოთახის ტემპერატურაზე 5წთ-ის განმავლობაში. ნარევს ემატებოდა 100 µl 5%-იანი ZnSO4 დაკვლავ ვანჯღრევდით 5 წთ-ის განმავლობაში. ამ დროის გასვლის შემდგომ მიღებული ნარევი ცენტრიფუგირდებოდა 3000ბრ.წთ-ის სიჩქარეზე 15 წთ-ის განმავლობაში. ყოველ 100 µl სუპერნატანტს ემატებოდა 200 µl გრისის რეაქტივი. გრისის რეაქტივი მზადდება ცდის წინ და შეიცავს 0.5 M HCl-ზე დამზადებულ VCl3-სადა 0.1%-იან სულფამიდამიდს. საკონტროლო სინჯარა შეიცავდა ყველა რეაქტივს,

თუმცა ჰომოგენატის მაგივრად სარეაქციო არეში შეტანილი იყო 100 µl დისტილირებული წყალი. მიღებული ნარევი ყოვნდებოდა 30წთ 37°C-ზე და შეფერილი ხსნარი იზომებოდა 540ნმ ტალღის სიგრძეზე სპექტროფოტომეტრიულად (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland). მიღებული მონაცემები ითვლებოდა $NaNO_2$-ის სტანდარტულ მრუდზე.

II.14. Ca-ის რაოდენობის განსაზღვრა

საკვლევ ნიმუშებში კალციუმის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის გამოყენებული იქნა კოლორიმეტრიული კიტი (Sigma-Aldrich, cat. # MAK022, St. Louis, MO, USA). იონის კონცენტრაცია ისაზღვრებოდა ქრომოგენური კომპლექსის რაოდენობის მიხედვით, რომელიც წარმოიმნება კალციუმის იონსა და o-კრეზოლფტალეინს შორის. ფერადი Ca^{2+}-კრეზოლფტალეინის კომპლესის შუქშთანთქმა იზომებოდა 575ნმ ტალღის სიგრძეზე და მიღებული სიდიდე პირდაპირპროპორციულია კალციუმის იონების შემცველობისა.

II.15. H_2O_2 -ის რაოდენობის განსაზღვრა

H_2O_2 -ის რაოდენობის დადგენისათვის გამოყენებული იქნა წყალბადის პეროქსიდის Assay Kit (ab102500). Horse Radish Peroxidase (HRP) თანაობით the OxiRed Probe ურთიერთქმედებს H_2O_2 და წარმოქმნის შეფერილ პროდუქტს (E = 570 nm).

II.16. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა MTT-ტესტით

კრეატინის გავლენას უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე ვსწავლობდით MTT-ტესტის საშუალებით, რომელიც დამყარებულია მიტოქონდრიული დეჰიდროგენეზების შესაძლებლობაზე, მოახდინოს ხსნადი 3(4,5-დიმეთილთიაზოლ

2-ილ)-2,5 დიფენილ--ტეტრაზოლიუმის ბრომიდის (**MTT**) გადაყვანა იისფერ უხსნად ფორმაზანში, რომელც კრისტალიზირდება ციტოპლაზმაში (Nathet al. 2005). ამისათვის ნატიურ ჰიპოკამპს ვაჰომოგენიზირებდით ტრის-HCl-ის ბუფერში, ვუმატებდით 0.5 მლ MTT -ს (5 მგ/მლ), ვაყოვნებდით 1 სთ-ის განმავლობაში და შემდგომ ბუფერს ვაცილებდით ცენტრიფუგირებით. მიღებულ ნალექს ემატებოდა100მკლ DMSO-ს ხსნარი ფორმაზანის კრისტალების გასახსნელად და კვლავ ყოვნდებოდა 2სთ-ის განმავლობაში და შემდგომ ვახდენთ ოპტიკური სიმკვრის განსაზღვრას 530 და 620 ნმ ტალღის პლანშეტური ანალიზატორის (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland) საშუალებით. სიცოცხლის უნარიანი უჯრედების რაოდენობას ვითვლიდით ფორმული:E =A570-A620, სადაცE-ოპტიკური სიმკვრივეა, ხოლო A570 და A620 მნიშვნელობა შესაბამის ტალღის სიგრძეზე. სტრესისა და კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე გამოითვლებოდა ფორმულით: **Nж** = $E_{ექსპერიმენტი}$ / $E_{საკონტროლო}$*100%.

II.17. Ca^{2+}-ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა

Ca^{2+}-ატფ-აზას აქტივობას ვსაზღვრავდით რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი არაორგანული ფოსფატის (PO3-) რაოდენობის მიხედვით. საკვლევი არე (1 მლ) შეიცავდა 50 mM ტრის-HCl-ის ბუფერს (pH 7.5), 0,4 mM CaCl2, 2mM ატფ და ნიმუში (0,05 მგ ცილა). 15 წთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ 37°C-ზე რეაქციას ვაჩერებდით 1,2მლ ცივი ტრიქლორძმარმჟავას დამატებით. ფერმენტის აქტივობას ვითვლიდით განსხვავებით სარეაქციო არეში Ca^{2+}-ის იონის არსებობა/არარსებობისას მიღებულ შედეგებს შორის.

II. 18. Na^{+}/K^{+} -ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა

Na/K-ATPაზური აქტივობა განისაზღვრება, როგორც ჯამური ATPაზას უაბაინმგრძნობიარე ნაწილი. ჯამური ATPაზასთვის საინკუბაციო არე შეიცავს-s NaCl-ს 120-145 mM კონცენტრაციის ფარგლებში, KCl_ს 5-20 mM, $MgCl_2$_ს 2-3 mM და ATP_ს

2-3 mM, 50mM ტრის-HCl ბუფერს (pH=7.7), რაც შეესაბამება Na/K-ATPაზას მუშაობის ოპტიმალურ პირობებს. არეში ფერმენტული პრეპარატის რაოდენობა არ აღემატება 100-150 mg-ს.

ოუაბაინ–მგრძნობიარე ნაწილი განისაზღვრება ზემოთაღნიშნულ არეში 0,2mM ოუაბაინის დამატებით, რაც Na^+-ის უბნის სრული დაკეტვის გარანტიას იძლევა. ჯამური და ოუაბაინმგრძნობიარე აქტივობას შორის სხვაობა შეადგენს Na,K-ATPაზურ აქტივობას და გამოითვლება ფორმული: μMPi/მგ ცილა/წთ.

სინჯარებს ყველა რეაგენტი ემატება 0-4^0 -ზე, რის შემდგომაც სინჯარები ინჯღრევა და თავსდება წყლიან აბაზანაში საინკუბაციოდ 37^0C-ზე. ინკუბაცია გრძელდება 10-15 წთ. რეაქცია ჩერდება ტემპერატურის სწრაფი ცვლილებით, სინჯარების ერთდროული გადატანით თერმოსტატიდან ყინულიან აბაზანაში, სადაც ყოვნდება 5 წთ, რის შემდგომაც იზომება არაორგანული ფოსფორი.

ATP-აზურ აქტივობაზე მსჯელობა ხდება ფერმენტის მიერ გამოყოფილი არაორგანული ფოსფორის რაოდენობის მიხედვით ფისკე-სუბაროუს მეთოდით [92].

II.19. ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდი

ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდი იძლევა შესაძლებლობას მოვახდინოთ ნიმუშში სპეციფიური

ცილების იდენტიფიცირება და ამასთანავე მოვახდინოთ მათი რაოდენობრივი ანალიზი. ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდი მოიცავს ორ ძირითად ეტაპს, ესენია:

1.SDS პოლიაკრილამიდ გელ-ელექტროფორეზი

2.მიღებული ცილოვანი ფრაქციების ტრანსფერი ნიტროცელულოზის მემბრანაზე და ანტისხეულებით მონიშვნა.

ცილების ფრაქციონირებას ვახდენდით ელექტროფორეზის ხელსაწყოს საშუალებით. სინჯებში ცილის რაოდენობა წინასწარ იყო განსაზღვრული ლოურის ცილის რაოდენობის განსაზღვრის მეთოდით და თითოეულ მათგანში იყო წარმოდგენილი თანაბარი კონცენტრაციით (40მკგ/30მლ-ში). სინჯებს ვუმატებდით იმავე მოცულობის ელექტროფორეზის სინჯის ბუფერს(20%-გლიცეროლი, 10%-მერკაპტოეთანოლი, 6%-ნატრიუმის დეოდეცილსულფატი(SDS), 0,02-0,04%

ბრომფენოლის ლურჯი 250Mm Tris-HCl, Ph-6,7) და ვადუღებდით 5 წუთის განმავლობაში. ელექტროფორეზის გაშვება ხდებოდა 10%-იან აკრილამიდ-ბისაკრილამიდის გელზე 110 ვოლტის სიმძლავრით ცილების სრულ დაყოფამდე. შემდგომი ეტაპს წარმადგენდა მიღებული ცილების ტრანსფერი ნიტროცელულოზის მემბრანაზე, რომლის დაბლოკვასაც ვახდენდით 5%-იანი ალბუმინის ხსნარით, შემდეგ უკვე ვახდენდით მემბრანაზე არსებული ცილების ანტისხეულებით მონიშვნას და გამჟღავნება ხორციელდებოდა რედგენის ფირებზე.

II. 20. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით

ფოლინ-ჩოკალტეუს ფენოლურ რეაქტივთან ცილის მოლეკულის შემადგენლობაში არსებული ამინომჟავები (ცისტეინი, თიროზინი) წარმოქმნიან ლურჯი შეფერილობის კომპლექსს. ეს უკანასკნელი ფოლინის აღდგენის შედეგად წარმოიქმნება.

ექსპერიმენტის პირველ ეტაპზე 0.4 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვუმატებდით 2 მლ C რეაქტივს, რომელიც თავის მხრივ მზადდება A ($NaHCO_3$-ის (უწყლო) 2%-იანი ხსნარი დამზადებული 1 N NaOH-ზე) და B (0.5%-იანი $CuSO_4 \times 5H_2O$ დამზადებული 1 %-იან ნატრიუმის ციტრატზე) რეაქტივების ურთიერთშერევით (50:1). ვურევდით და ვაყოვნებდით 10 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე.

შემდგომ ეტაპზე ნარევს ვუმატებდით 200 μლ ფოლინის რეაქტივს, ვურევდით და ვაყოვნებდით 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემერატურაზე [12].

მიღებულ შეფერილობას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=750 ნმ) და ვითვლიდით ცილის კონცენტრაციას შემდეგი ფორმულით:

$$C = K \times E_{საშ.} (mg/ml)$$

სადაც:
C - ცილის კონცენტრაცია,
Eსაშ - მიღებული შუქშთანთქმების საშუალო,
K - მუდმივა.

II. 21. სტატისტიკური ანალიზი

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

თავი III. მიღებული მონაცემები

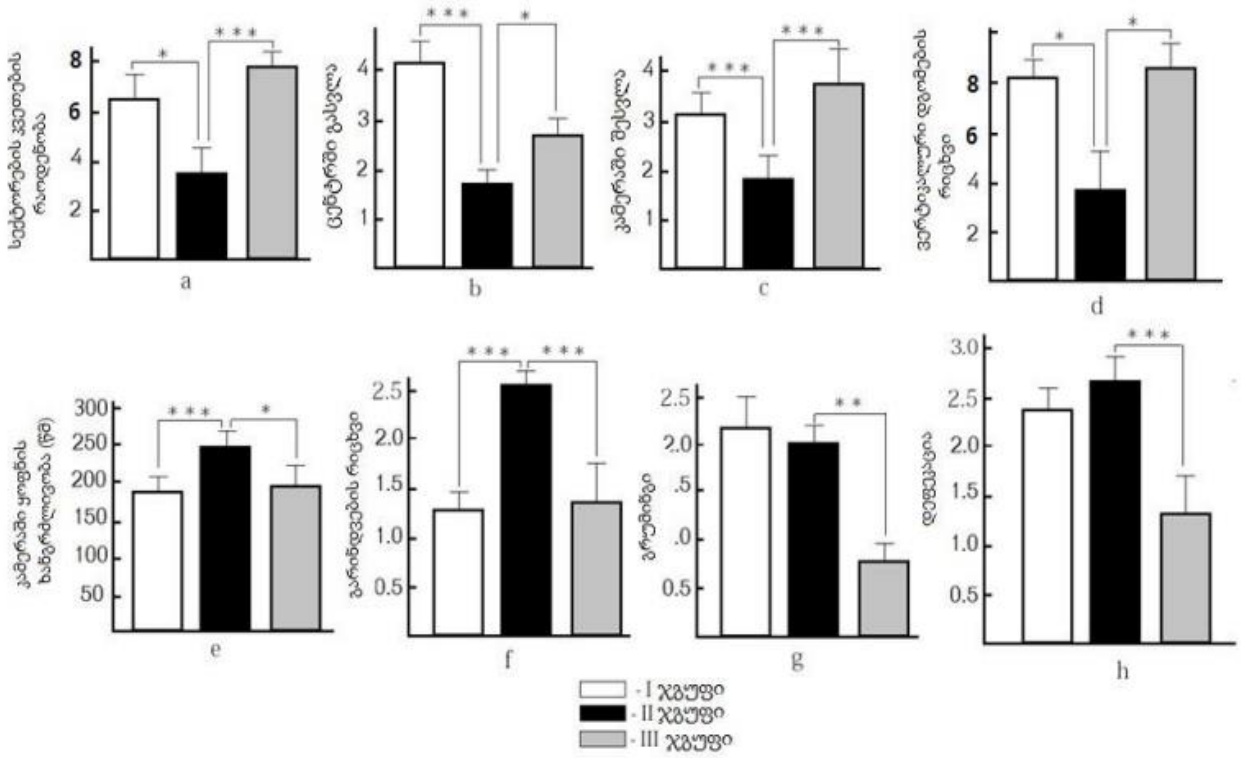
III.1. თაგვების ქცევითი პარამეტრების განსაზღვრა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

ცდების საწყისს ეტაპზე შევისწავლეთ საკონტროლო (G1) , სტრესირებული (G2) და სტრესირებული ჯგუფის, რომლებსაც ყოველდღიურად ეგზოგენურად შეყვანილი ჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი (G3) , ცხოველების ფსიქო-ემოციური მდგომარეობა „ღია ველის“ ექსპერიმენტის საშუალებით. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 1.

მონაცემები აჩვენებენ, რომ საკონტროლო ცხოველებთან (G1- ჯგუფი) შედარებით ხანგრძლივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის შედეგად სტრესირებული ცხოველები (G2-ჯგუფი) ხასიათდებიან კვლევითი აქტივობის მაჩვენებლების კლებითა და შიშის რეაქციების რაოდენობის მატებით. მაგალითად, სარწმუნოდაა შემცირებული დიდი კაბინის სექტორების გადაკვეთების რაოდენობა (a) (3.34±0.4 vs 1.9±0.4; t(18)=7,106; p=0.001, n1=n2=10), ცენტრში გამოსვლის რაოდენობა (b) (3.32±0.4 vs 1.61±0.4; t(18)=8,568; p=0.0001; n1=n2=10), კამერაში შესვლის რაოდენობა (c) (3.1±0.4 vs 1.8±0.4; t(18)=6,879; p=0.001; n1=n2=10) და ვერტიკალური დგომების რიცხვი (d) (2.13±0.4 vs 0.99±0.1 t(28)=3,378; p=0.001, $n_1=n_2=10$). ამის პარალელურად, შეინიშნება შიშის რეაქციების პარამეტრების სარწმუნო მატება, კერძოდ ბნელ კამერაში ყოფნის ხანგრძლივობა (e) (186,25±27.4 vs 251,22±25.63; t(18)=-5.475; p=0.001; n1=n2=10) და გარინდვების (f) რიცხვი (1.55±0.07 vs 2.68 ±0.3; t(18)=-4.552; p=0.001; $n_1=n_2=10$). რაც შეეხება გრუმინგების (g) (2.20±0.1 vs 2.0±0.8; t(28)=0,000; p=1.000; $n_1=n_2=10$) და დეფეკაციის (h) (2.40±1.1 vs 2.86±0; t(18)=-1,249; p=0.222, $n_1=n_2=10$) რაოდენობას, სარწმუნო ცვლილებები არ დაფიქსირებულა (სურ.1).

იმისათვის, რათა დაგვედგინა კრეატინის ორგანიზმში შეყვანით რამდენად იცვლება სტრესირებული ცხოველის ფიზიოლოგიური მახასიათებლები, შესწავლილი იქნა მესამე ჯგუფის ვირთაგვების ქცევითი პარამეტრები. ექსპერიმენტმა აჩვენა, G3 ჯგუფის ცხოველებს, G2 ჯგუფის ინდივიდებთან შედარებით, ეცვლებათ ქცევითი მახასიათებლები. კერძოდ, აღინიშნება a (1.9±0.4 vs 3.87±0.6; t(18)=-8,158; p=0.0001; $n_1=n_2=10$), b (1.61±0.4 vs 2.75 ±0.4; t(28)=-3,089; p<0.005, $n_1=n_2=10$), c (1.88±0.3 vs 3.86±1.4;

t(28)=-5,010; p=0.0001, $n_1=n_2=10$) და d (2.13±0.4 vs 0.99±0.1; t(18)=7,275; p=0.0001; $n_1=n_2=10$) პარამეტრესის გაზრდა და e (245.86±38.44 vs 208.80±24.38; t(28)=3,117; p= 0.001, $n_1=n_2=10$), f (2.68 ±0.3 vs 1.41 ± 0.04; t(18)=6,794; p=0.001; $n_1=n_2=10$), g (2.0±0.8 vs 0.86±0.07; t(28)=3,900; p=0.001, $n_1=n_2=10$) და h (2.75 ±0.3 vs 1.45 ± 0.05; t(18)=6,546; p=0.0001 $n_1=n_2=10$) პარამეტრების შემცირება. როგორც სურათი 1-დან ჩანს, G3 ჯგუფის ცხოველები, G2 ჯგუფთან შედარებით, ყველა პარამეტრის მიხედვით აუმჯობესებენ ფიზიოლოგიურ მაჩვენებლებს.

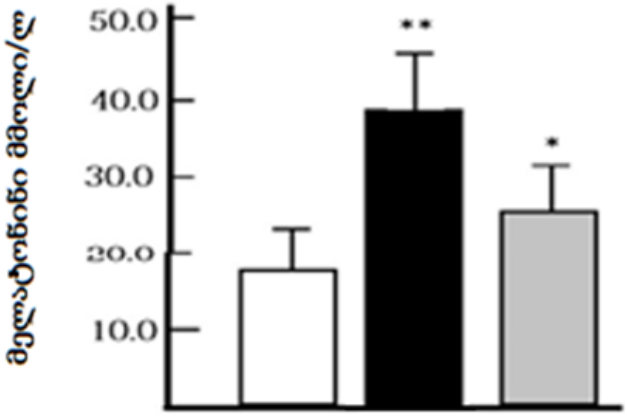


სურათი 1. ინტრაპერიტონიალური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვების ქცევით რეაქციებზე.

□ - G1-ჯგუფი (საკონტროლო); ■- G2 ჯგუფი(სტრესირებული); ▭ – G3ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი) პარამეტრებზე. a)გდაკვეთის რაოდენობა b)ცენტრში გამოსვლის რაოდენობა c) კამერაში შესვლის რაოდენობა d)ვერტიკალური დგომების რიცხვი; e) ბნელ კამერაში ყოფნის ხანგრძლივობა(sec.); f) გარინდების რიცხვი; g) გრუმინგი; h) დეფეკაცია. სტანდარტული გადახრა ± SD თითოეულ სვეტზე (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

III.2. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში ზოგიერთი ჰორმონის რაოდენობრივი ცვლილება

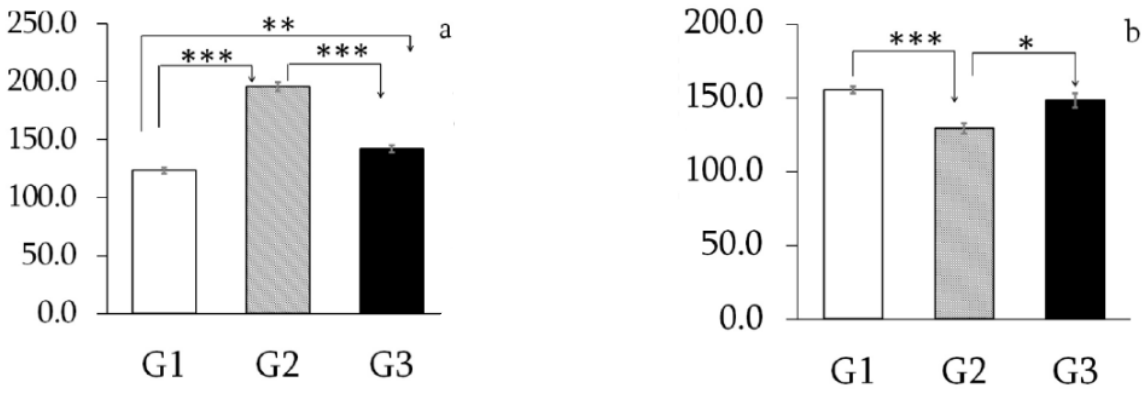
ექსპერიმეტის შემდეგ საფეხურზე სტრესის მონიტორინგისათვის სამივე ჯგუფის ცხოველების სისხლში განისაზღვრა ჰორმონ მელატონინის რაოდენობა. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ 30-დღიანი სტრესის შედეგად სისხლის პლაზმაში აღინიშნება მელატონინის შემცველობის დაახლოებით 20.5%-იანი მატება, თუმცა კრეატინის შეყვანა ამ მაჩვენებელს არ ცვლიდა. (სურ.2).



სურათი 2 . მელატონინის რაოდენობრივი ცვლილება სისხლში 30 -დღიანი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

□-G1ჯგუფი(საკონტროლო); ■ -G2 ჯგუფი(სტრესირებული); □- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი). *სტანდარტული გადახრა ± SD თითოეულ სვეტზე (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$).*

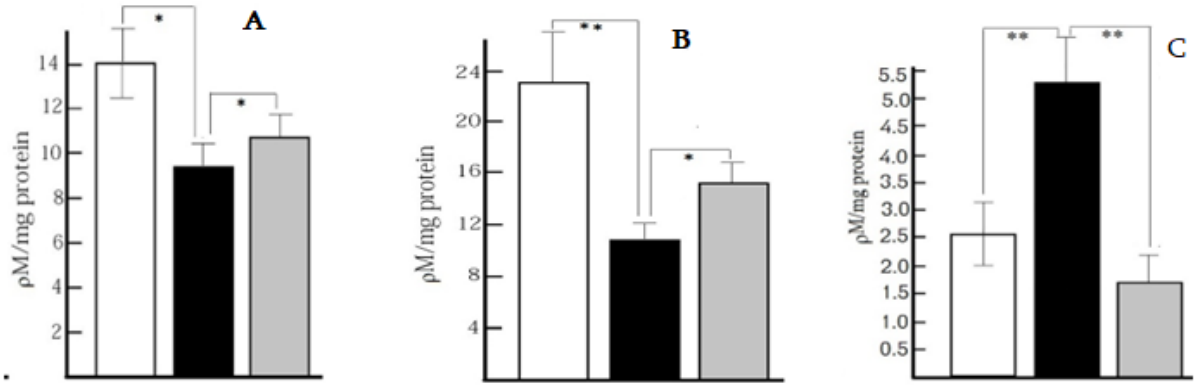
განსხვავებული შედეგები დაფიქსირდა სეროტონინისა და კორტიკოსტერონის შემთხვევაშიც. მაგალითად, 30 დღიანი სტრესის პირობებში შეინიშნება სეროტონინის რაოდენობის მატება, თუმცა კრეატინის შეყვანისას მართალია G2ჯგუფთან შედარებით მისმა რაოდენობამ დაიკლო, მაგრამ საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით იგი სარწმუნოდ მომატებული რჩება. განსხვავებული შედეგები აღმოჩნდა კორტიკოსტერონის განსაზღვრისას, კერძოდ, ამ უკანასკნელის რაოდენობა სტრესირებულ ცხოველების სისხლის პლაზმაში დაახლოებით 27%-ით მცირდება (სურ.3) ხოლო კრეატინის ეგზოგენური მიწოდება ზრდის მის შემცველობას.



სურათი 3 . სეროტონინისა (a) და კორტიკოსტერონის (b) რაოდენობრივი ცვლილება სისხლში 30 -დღიანი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

□-G1ჯგუფი(საკონტროლო); ▭-G2 ჯგუფი(სტრესირებული); ■- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი). *სტანდარტული გადახრა ± SD თითოეულ სვეტზე* (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

შემდგომ ექსპერიმეტში განსაზღვრულ იქნა კატექოლამინების რაოდენობაც სამივე ჯგუფის ცხოველებში. აღმოჩნდა, რომ ნორადრენალინის და ადრენალინის რაოდენობა სარწმუნოდ მცირდება სტრესირებულ ცხოველებში, ხოლო კრეატინის მიწოდების ფონზე ეს მაჩვენებლი საკონტროლო მნიშვნელობას უახლოვდება. განსხვავებული შედეგები გამოვლინდა დოფამინის განსაზღვრიასას, კერძოდ, მისი სისხლში შემცველობა მეორე ჯგუფის ცხოველებში იზრდება (სურ 4).



სურათი 4 . კატექოლამინების რაოდენობრივი ცვლილება სისხლში ცირკადული რიტმის დარღვევით განპირობებული სტრესის პირობებში

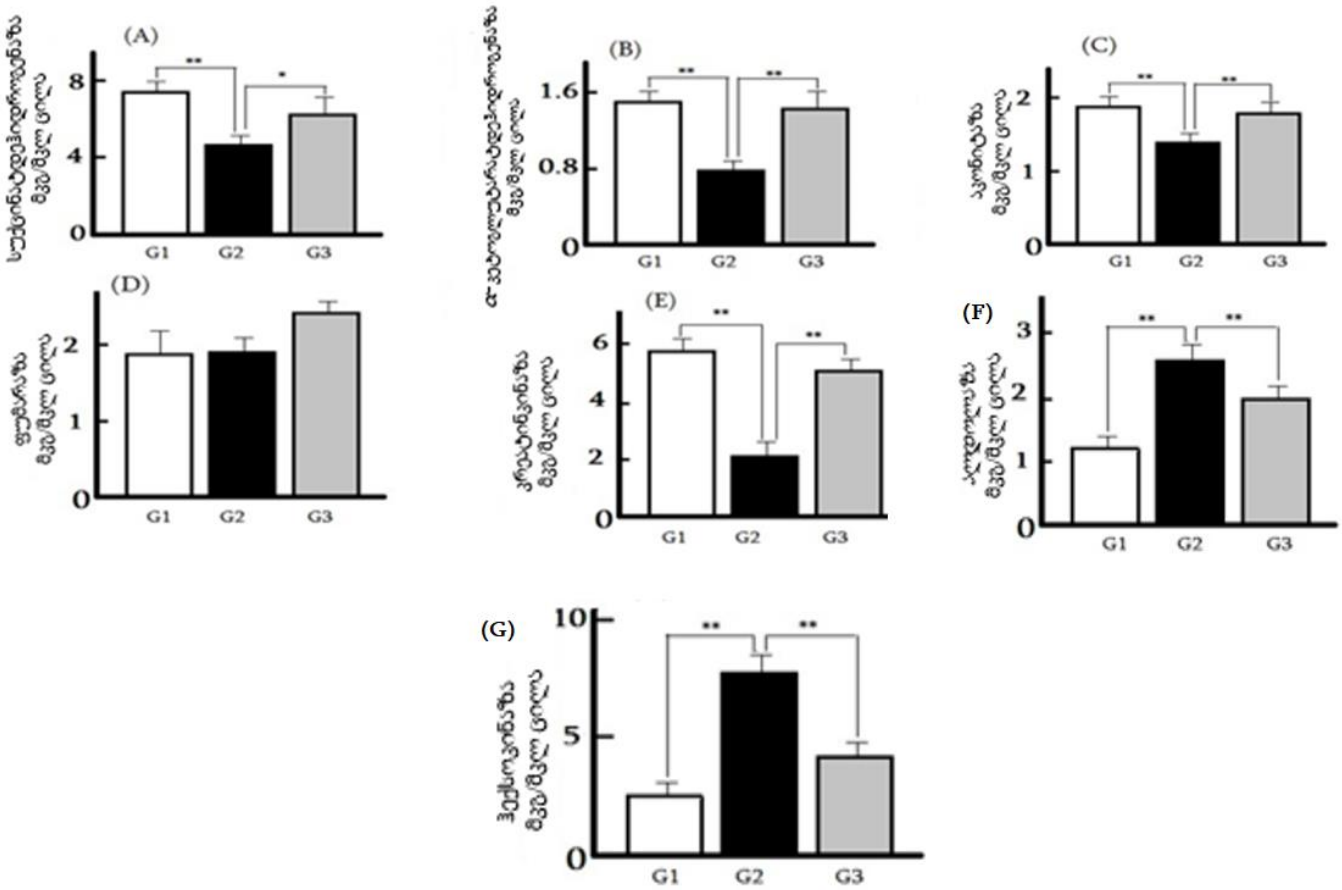
A-ნორადრენალინი, B-ადრენალინი , C–დოფამინი

▭-G1ჯგუფი(საკონტროლო); ■ -G2 ჯგუფი(სტრესირებული); ▭- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი). *სტანდარტული გადახრა ± SD თითოეულ სვეტზე* (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

ზემოთთქმულიდან გამომდინარე იკვეთება, რომ 30 დრიანი ცირკადული რიტმის დარღვევა არ წარმოადგენს საკამოდ ძლიერ სტრესს-ფაქტორს, რომელიც აისახება ექსპერიმეტული ცხოველების როგორც ქცევით მახასიათებლებზე, ასევე მათ ჰორმონალურ შემცველობაზეც.

III.3. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობაზე ეგზოგენური კრეატინის გავლენის შესწვლა

კვლევის შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობა და ამ მაჩვენებელზე ეზოგენური კრეატინის ეფექტი. სურათზე 5 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებენ, რომ ლაბორატორიული ვირთაგვების ხანგრძლივი, 30 დღიანი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში (IIG) საკონტროლო ჯგუფთან (IG) შედარებით შეინიშნება მიტოქონდრიული ფერმენტების, სუქცინატდეჰიდროგე-ნაზას, α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას, აკონიტაზას და კრეატინკინაზას აქტივობის შემცირება. თუმცა სტრესის პარალელურად, Cr-ის ეგზოგენური მიწოდება (III G) სარწმუნოდ ზრდის მათ აქტივობას (სურ. 5 A,B,C,E). ამ ფერმენტებისაგან განსხვავებით, არ იცვლება ფუმარაზას აქტივობა, თუმცა Cr-ის ეგზოგენურად შეყვანისას (3G) II ჯგუფის ინდივიდებთან შედარებით ასევე შეინიშნება ამ ფერმენტის აქტივობის სარწმუნო მატება (სურ.5 D).



სურათი 5. ჰიპოკამპის უჯრედებში სუქცინატდეჰიდროგენაზას (A), α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას (B), აკონიტაზასა (C), ფუმარაზას (D), კრეატინკინაზას (E), ალდოლაზასა (F) და ჰექსოკინაზას (G) აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში და მათი ცვლილება ეგზოგენური კრეატინის მიწოდებისას

□-G1ჯგუფი(საკონტროლო); ■ -G2 ჯგუფი(სტრესირებული); ▭- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი). *სტანდარტული გადახრა ± SD თითოეულ სვეტზე* (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

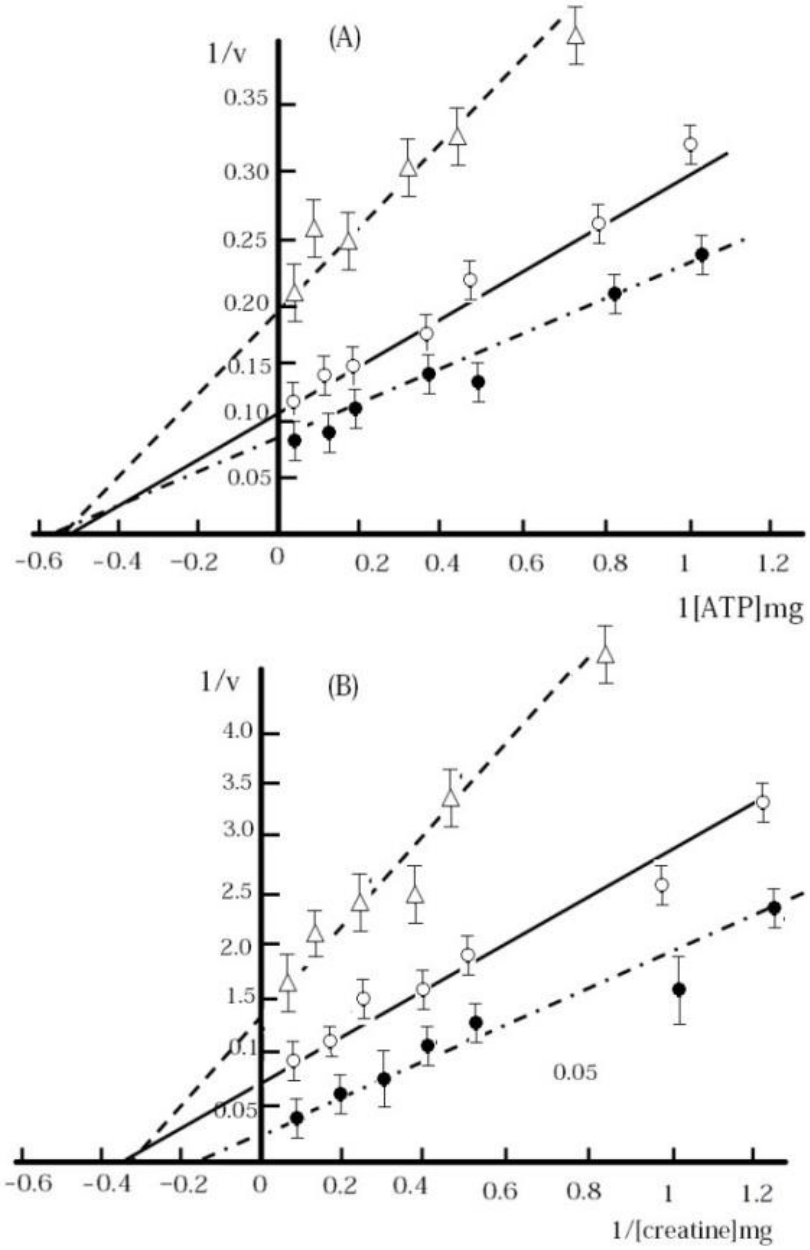
განსხვავებული შედეგები მივიღეთ გლიკოლიზის პროცესში მონაწილე ფერმენტების შემთხვევაში. ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა ამ პროცესის ორი ფერმენტი ალდოლაზა (სურ.5F) და ჰექსოკინაზა (სურ.5G). ცნობილია, რომ ალდოლაზა უშუალო სიახლოვესაა მიტოქონდრიებთან და იქ წარმოქმნილ ROS-თან. ამის გათვალისწინებით, ჩვენ ვვარაუდობდით, რომ ადგილი ექნებოდა ამ ფერმენტის აქტივობის დაქვეითებას. თუმცა, მიღებულმა მონაცემებმა აჩვენა საპირისპირო ეფექტი, კერძოდ ალდოლაზას აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მატულობს და Cr-ის დამატება არ ცვლის მის აქტივობას.

განსხვავებული მონაცემები მივიღეთ ჰექსოკინაზას შემთვევაში (სურ.5G). ვნახეთ, რომ ჰექსოკინაზას აქტივობა, ალდოლაზას ანალოგიურად მატულობს G2-ის ვირთაგვების ჰიპოკამპში და Cr-ის ეგზოგენური დამატება ამ ფერმენტის აქტივობას (3G) აახლოვებს საკონტროლო მაჩვენებს (G1). იმის გათვალისწინებით, რომ ჰექსოკინაზა წარმოადგენს გლიკოლიზის მალიმიტირებელ ფერმენტს, სავარაუდოა, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა აძლიერებს თავის ტვინში გლუკოზის ანაერობულ მეტაბოლიზმს.

ამდენად, მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მიმდინარე ოქსიდაციური სტრესის დროს, მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორილირების შემცირების პარალელურად, ადგილი აქვს გლიკოლიზური პროცესების გაძლიერებას, რაც თავის მხრივ, სტრესის პირობებში ჟანგვითი ფოსფორილირების დაქვეითების შემთხვევაში ენერგეტიკული პოტენციალის შენარჩუნების შესაძლებლობას იძლევა.

III.4. კრეატინკინაზას კინეტიკური პარამეტრების (Vmax, Km) ცვლილება ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

შემდგომ ექსპერიმენტში საინტერესოს წარმოადგენდა დაგვედგინა ფერმენტების აქტივობის ცვლილების მიზეზი ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში და Cr-ის გავლენა ამ პროცესზე. ეს საკითხი შესწავლილი იქნა ფერმენტ კრეატინკინაზას (CK) კინეტიკური მახასიათებლების (V_{max}, Km) ცვლილების მაგალითზე. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 6.



სურათი 6. ეგზოგენური კრეტინის გავლენა კრეტინკინაზას კინეტიკურ პარამეტრებზე (*V*max, *K*m).

○ – საკონტროლო ჯგუფი(G1); Δ – სტრესირებული ჯგუფი (G2); ● –- სტრესირებული+ კრეატინი (G3)

x ღერძზე - აქტივობის შებრუნებული სიდიდე– *1/V*, *y-ღერძზე* -სუბსტრატის კონცენტრაცია

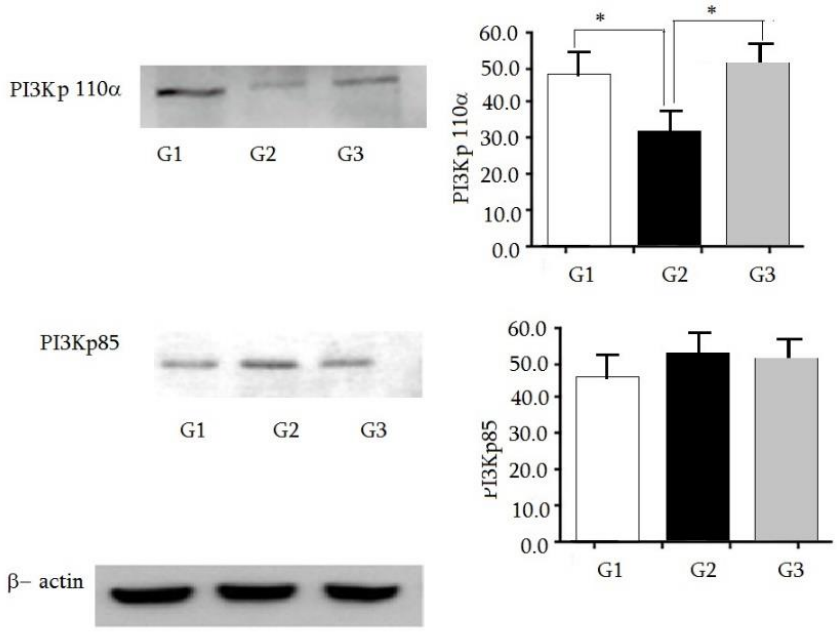
მიღებულმა მონაცემებმა აჩვენა, რომ ხანგრძლივი დღე-ღამური ციკლის დარღვევის პირობებში მიმდინარე სტრესის შემთხვევაში ადგილი აქვს ფერმენტის როგორც V_{max}-ის დაქვეითებას, ასევე K_m-სიდიდის გაზრდას. მიღებული მონაცემები გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში CK- ს აქტივობის შემცირების ძირითად მიზეზს წარმოადგენს ამ პირობებში CK-ს

რაოდენობის შემცირება, რისი მიზეზიც სავარაუდოდ, სინთეზური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითების მაჩვენებელია. წარმოდგენილი სურათიდან ასევე ჩანს, რომ Cr-ის ეგზოგენური მიწოდების პირობებში გაზრდილია ფერმენტის V_{max}, რისი მიზეზიც, შესაძლებელია იყოს ეგზოგენური კრეატინის პროტექტორული ეფექტი სინთეზურ რეაქციებზე.

III.5. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა PI3K / AKT / mTOR სასიგნალო გზაზე

შემდგომი ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა იმ უჯრედშიდა სასიგნალო გზების შესწავლა, რომლებიც განსაზღვრავენ ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმს ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევისას და ასევე Cr-ის პრევენციული მექანიზმის შესწვლა ამ პროცესის მიმდინარეობაზე. ამის გათვალისწინებით, შესწავლილი იქნა *PI3K/ AKT / mTOR* სასიგნალო გზა, რომელიც როგორც ცნობილია, ითვლება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და სინთეზური რეაქციების ერთერთ ძირითად რეგულატორად. ცდების საწყისს სტადიაზე შესწავლილი იქნა ცირკადული რიტმის 30-დღიანი დარღვევის პირობებში განვითარებული ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში სასიგნალო გზის I კომპონენტის ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3 კინაზას სუბერთეულების p110α-ისა და p85-ს რაოდენობრივი ცვლილებები და ეგზოგენურად შეყვანილი Cr-ის ეფექტი ამ მაჩვენებელზე. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 7, საიდანაც ირკვევა, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში აღინიშნება PI3K-ს კატალიზური სუბერთეულის p110α-ის რაოდენობრივი შემცირება, თუმცა სტრესის პარალელურად Cr-ს ინტრაპერიტონიალური შეყვანა ზრდის ამ მაჩვენებელს (სურ 8). ცნობილია, რომ კატალიზური სუბერთეულის უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს *PI3K-ს* რეგულატორული p85-სუბერთეული. ცნობილია, რომ ამ სუბერთეულის აქტივაცია ხელს უშლის კატალიზური სუბერთეულის ფოსფორილირებას და შესაბამისად, მისი აქტივაციის გაძლიერებას. ჩვენს მიერ წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, რომ G2 ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის უჯრედებში სარწმუნოდაა შემცირებული აქტივირებული *PI3K* p110α სუბერთეულის

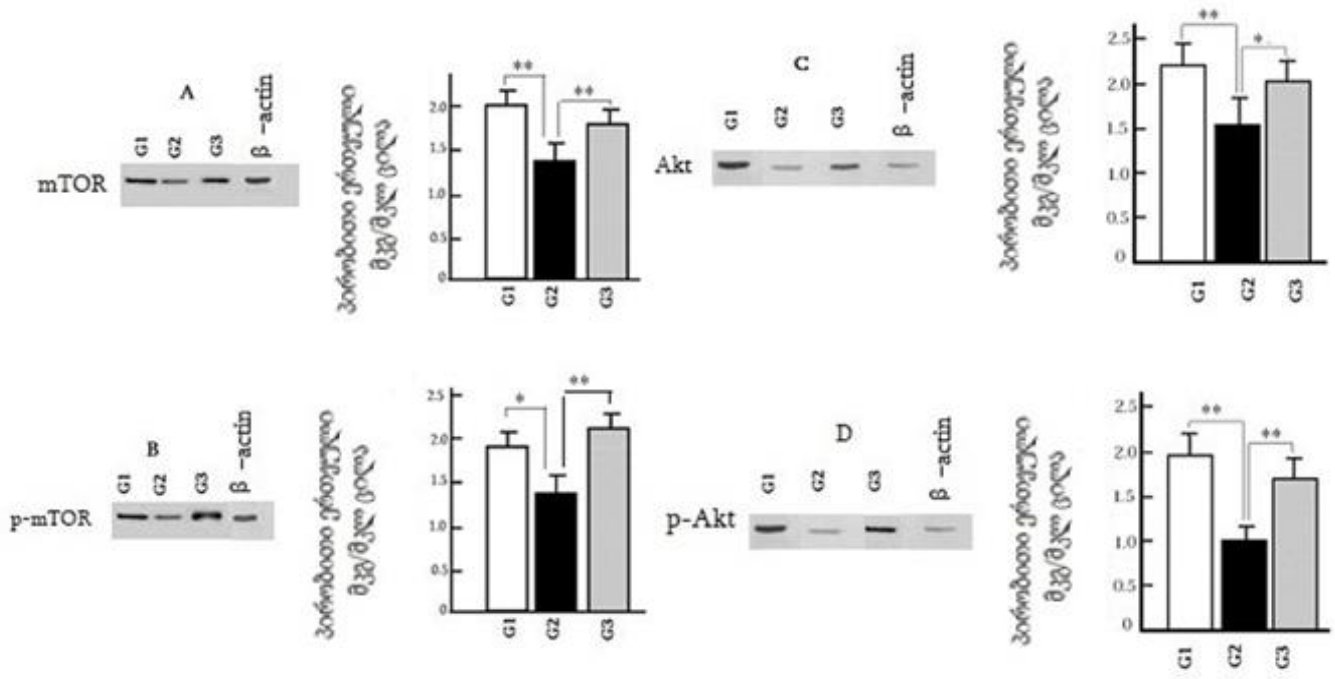
რაოდენობა, თუმცა ამ პირობებში ჩვენს მიერ ვერ იქნა ნანახი აქტიური *PI3K* p85-სუბერთეულის რაოდენობრივი მატება.



სურათი 7. *PI3K* p110α-სა და *PI3K* p85-ის რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი რაოდენობრივი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

G1- საკონტროლო ჯგუფი; G2- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; G3- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილიჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი. სტანდარტული გადახრა ± SD თითოეულ სვეტზე (*$p < 0.05$).

შემდგომ ექსპერიმენტში შევისწავლეთ ამ სასიგანლო გზის მნიშვნელოვანი რგოლის, კერძოდ, ტოტალური და ფოსფორილირებული ცილა mTOR-ის რაოდენობრივი ცვლილებები როგორც G2, ასევე G3-ჯგიფოს ცხოველების ჰიპოკამპის უჯრედებში. ნანახი იქნა, რომ mTOR-ის რაოდენობა G2-ის ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო (G1) მონაცემებთან შედარებით სარწმუნოდ მცირდება, ხოლო G3-ის ინდივიდებში შეინიშნება ამ მაჩვენებლის სარწმუნო ზრდა და ეს მაჩვენებალი საკონტროლო სიდიდეს უახლოვდება (სურ. 8A). ანალოგიური ცვლილებები შეინიშნება ფოსფორილირებული mTOR-ის შემთხვევაშიც (სურ. 8B).



სურათი 8. mTOR (A), ფოსფორილირებული mTOR (B), AkT-ს (C) და ფოსფორილირებლი AkT(D) რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი რაოდენობრივი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

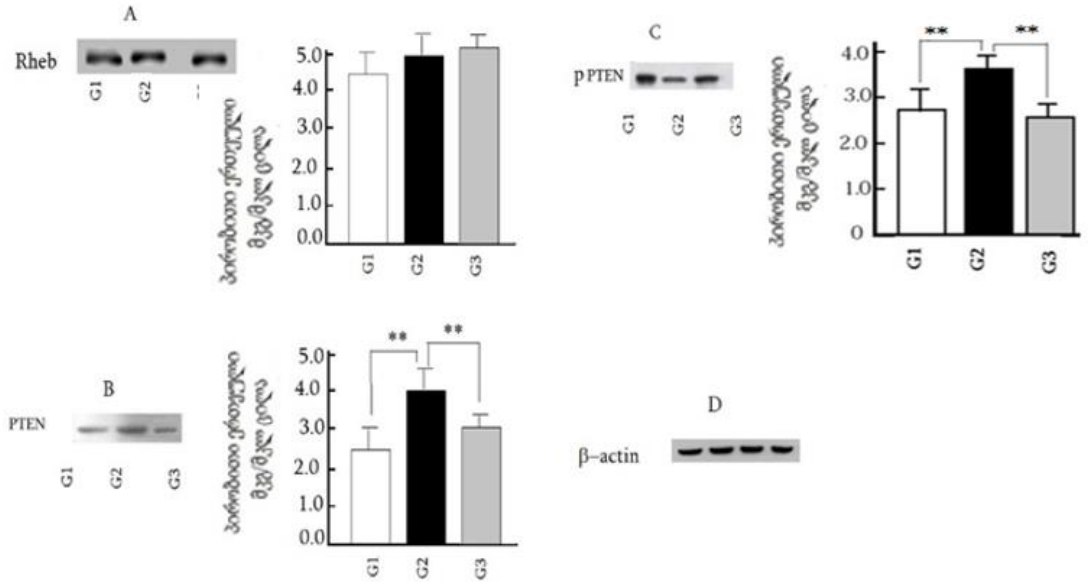
*G 1- საკონტროლო ჯგუფი; G 2- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; G3 - ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილი ჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი. მონაცემები წარმოდგენილია როგორც საშუალო მნიშვნელობის ± SD (N=5). * – p<0,05; ** – p<0,001 კონტროლთან შედარებით.*

mTOR-ის პარალელურად შესწავლილი იქნა ასევე ამ სასიგნალო გზის კიდევ ერთი კომპონენტი, კერძოდ, ფერმენტი AKT (პროტეინკინაზა PKB). როგორც სურათი 8C და 8D-დან ჩანს G2- ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით აღინიშნება ამ ფერმენტის როგორც ტოტალური რაოდენობის შემცირება, ასევე სარწმუნოდაა შემცირებული ფოსფორილირებული AKT-ს რაოდენობაც. ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პარალელურად, Cr -ის ეგზოგენური მიწოდება ასევე სარწმუნოდ ზრდის ფოსფორილირებული AKT-ს რაოდენობასაც.

ცნობილია, რომ AKT-ს რეგულაციის პროცესში ჩართულია ცილა Rheb, თუმცა ჩვენს ექსპერიმენტში ამ ცილის რაოდენობრივი ცვლილებები საკვლევ ჯგუფებში ვერ იქნა ნანახი (სურ. 9A).

ცნობილია, რომ Akt-ს აქტივობის კიდევ ერთერთ რეგულატორს წარმოადგენს PTEN - ფოსფატაზური აქტივობის ფერმენტი. PTEN -ის აქტიურობის გაზრდა იწვევს AkT/PKB-ის აქტივობისა და შესაბამისად, IP3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზის მიმდინარეობის ცვლილებას. ამის გათვალისწინებით, შემდგომ ექსპერმენტში განსაზღვრული იქნა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში PTEN -ის აქტიური ფორმის რაოდენობრივი ცვლილებები (სურ.9 B,C). აღმოჩნდა, რომ ამ პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში გაზრდილია ამ ფერმენტის როგორც საერთო, ასევე აქტივირებული ფორმის შემცველობა. ამავე სურათებიდან ჩანს, რომ Cr -ის ეგზოგენური გზით ხანგრძლივი შეყვანა ამცირებს PTEN -ის აქტიური ფორმის რაოდენობას, რასაც შესაბამისად, მოსდევს AKT/PKB-ის რაოდენობრივი მატება.

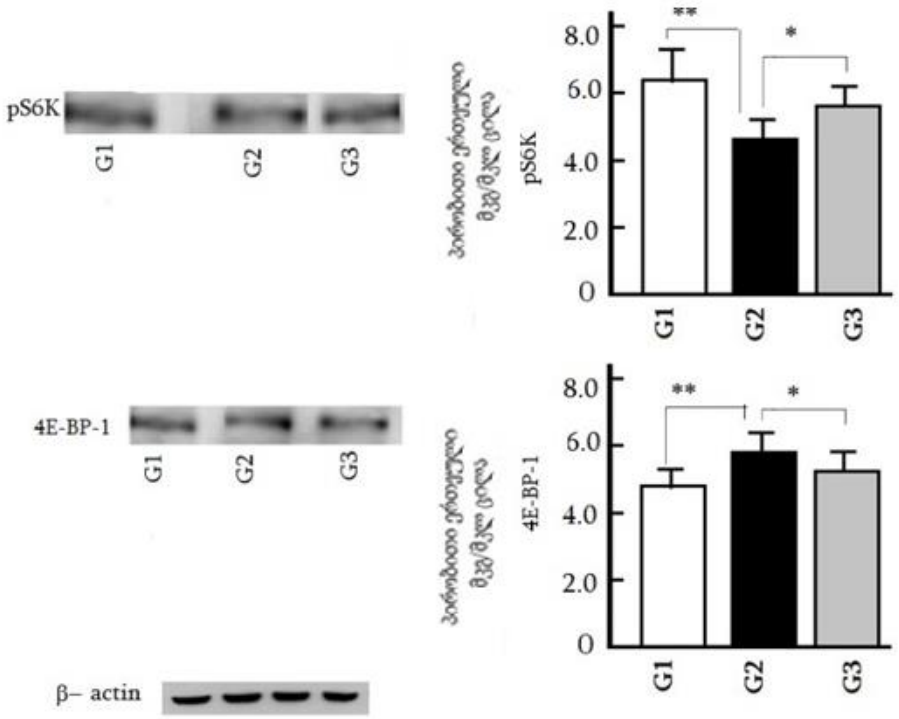
ზემოთ მოყვანილი მონაცემების გათვალისწინებით, იმის დასადგენად, თუ რამდენადაა შეცვლილი ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში ცილების სინთეზის ინტენსივობა და ახდენს თუ არა ამ პროცესზე ეგზოგენური Cr დადებით ეფექტს, შესწავლილი იქნა რიბოსომული კინაზა S6-ს (p70S6K) და ეუკარიოტული ინიციაციის ფაქტორის შემბოჭველი ცილის 4E-BP-1-ის (eukaryotic initiation factor 4E-1 (elF4E)-binding protein 1) აქტიური ფორმების რაოდენობრივი ცვლილებები (სურ.10 A,B).



სურათი 9. Rheb-ი ს (A), PTEN -ისა (B) და აქტივირებული PTEN-ის (C) რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის დროს და მათი რაოდენობრივი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

*G 1 - საკონტროლო ჯგუფი; IG 2-ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; IG 3 - ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილიჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი. მონაცემები წარმოდგენილია როგორც საშუალო მნიშვნელობის ± SD (N=3). * – p<0,05; ** – p<0,001 კონტროლთან შედარებით.*

როგორც წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, ბუნებრივი დღე-ღამური ციკლის ცვლილების პირობებში (G2) შემცირებულია აქტივირებული p70S6K-ს რაოდენობა, რომელიც იზრდება G3-ჯგუფოს ჰიპოკამპის უჯრედებში. საპირისპირო მონაცემებია 4E-BP-1-ს შემთხვევაში. სურათიდან ჩანს, რომ IIG უჯრედები ხასიათდებიან აქტივირებული 4E-BP-1-ს მაღალი შემცველობით, რაც შესაბამისად აფერხებს ცილების სინთეზის მიმდინარეობას. G3 -ის ჰიპოკამპში აღინიშნება ამ ფაქტორის აქტივირებული ფორმის რაოდენობის შემცირება, რაც მიუთითებს ეგზოგენური Cr-ის შეყვანისას ცილის სინთეზის პროცესის გააქტიურებას.

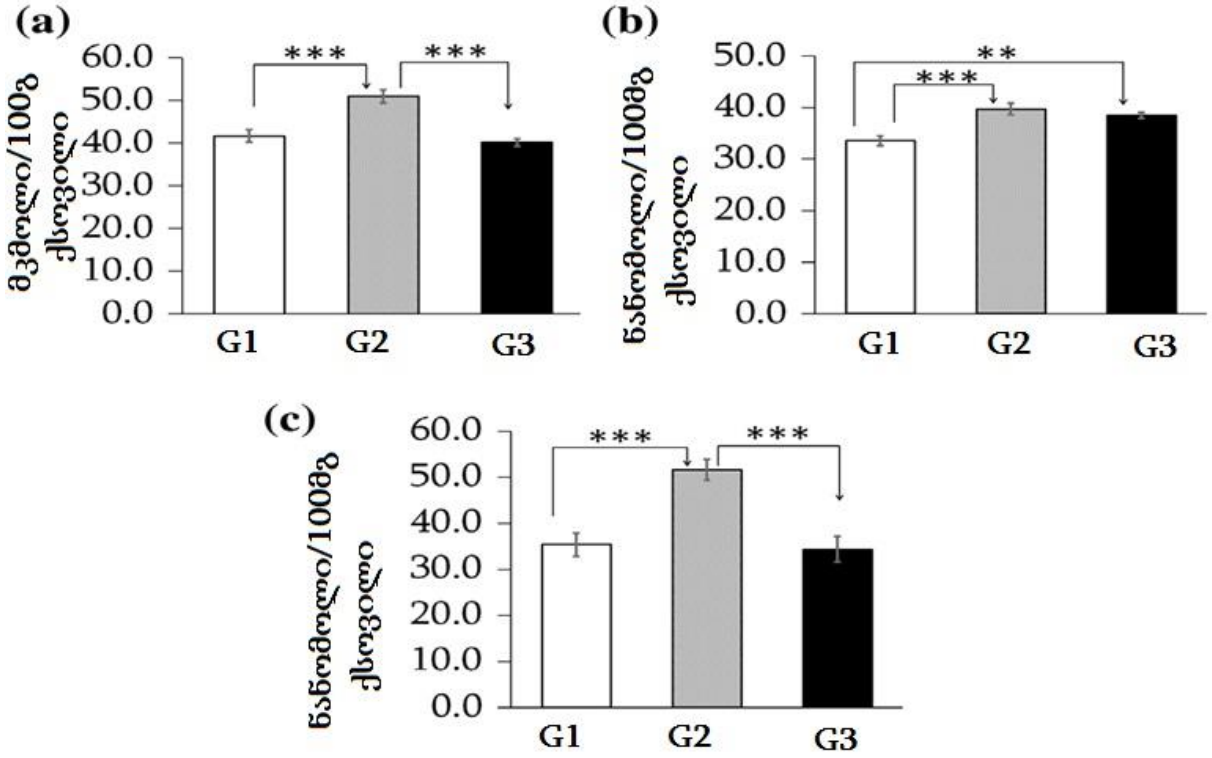


სურათი 10. რიბოსომული კინაზა S6-ისა (A) და ცილა 4E-BP-1-ს (B) აქტივირებული ფორმების რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

*G 1- საკონტროლო ჯგუფი; G 2- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; G 3 - ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილიჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი. მონაცემები წარმოდგენილია როგორც საშუალო მნიშვნელობის ± SD (N=3). * – p<0,05; ** – p<0,001 კონტროლთან შედარებით.*

III.6. NO-სა, წყალბადის ზეჟანგისა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილებების დადგენა

შემდგომ ექსპერიმენტში განვსაზღვრეთ ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში NO-სა, წყალბადის ზეჟანგისა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილებები. ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, ვირთაგვების თავის ტვინში შეინიშნება ზოგიერთი ბიოქიმიური მახასიათებლების ცვლილება, მაგალითად ექსპერიმენტის 30-ე დღეს სტრესირებული ვირთაგვების (G2 ჯგუფი) ჰიპოკამპის უჯრედებში, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით NO-ს შემცველობა სარწმუნოდაა მომატებული. ამის პარალელურად, იმ ვირთაგვებში, სადაც სტრესი მიმდინარეობდა 140მგ/კგ კრეატინის ყოველდღიური შეყვანის პირობებში (G3 ჯგუფი), ექსპერიმენტის 30-ე დღეს NO-ს რაოდენობა საკონტროლო ჯგუფის მაჩვენებელს უახლოვდა (სურ.9). თუმცა ცვლილებები ვერ ვნახეთ H_2O_2-ს შემთხვევაში. კერძოდ, სტრესის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში შეინიშნება მისი რაოდენობის ზრდა და ორგანიზმში ეგზოგენური კრეატინის ყოველდღიური მიწოდება მის რაოდენობას სარწმუნოდ არ ცვლის.

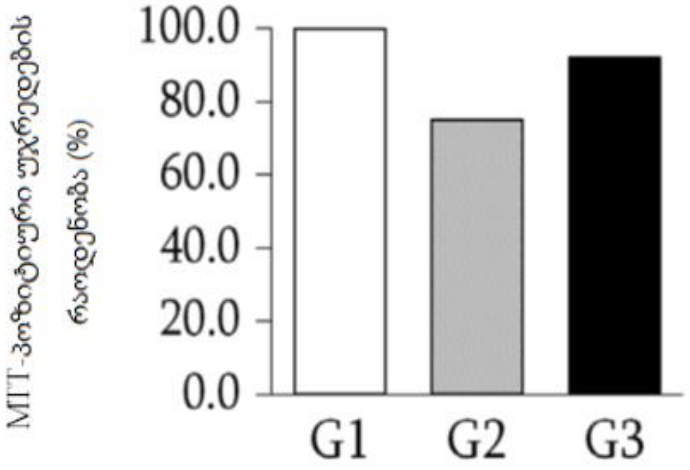


სურათი 11 . კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში NO-ის, H_2O_2-სა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივ შემცველობაზე

□-G1ჯგუფი(საკონტროლო); □-G2 ჯგუფი(სტრესირებული); ■- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი) (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.)

წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, რომ ცვლილებები ჩანს ასევე Ca^{2+}-ის იონის რაოდენობაშიც. კერძოდ, G2 ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო G1 ჯგუფთან შედარებით Ca^{2+}-ის რაოდენობა მნიშვნელოვნადაა გაზრდილი (≈26%). ამის პარალელურად, კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა (G3 ჯგუფი) ამცირებს მის რაოდენობას.

იმის გათვალისწინებით, რომ ცნობილია უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის ჭარბი რაოდენობის ციტოტოქსიკური ეფექტი უჯრედის ფუნქციონირებაზე, შესწავლილი იქნა კრეატინის გავლენა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის მაჩვენებელზე (სურ. 12). აღმოჩნდა, რომ სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპში საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით, შემცირებულია უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა, იმ დროს როცა G3 ჯგუფის ინდივიდებში იგი საკონტროლო მაჩვენებელს უახლოვდება.

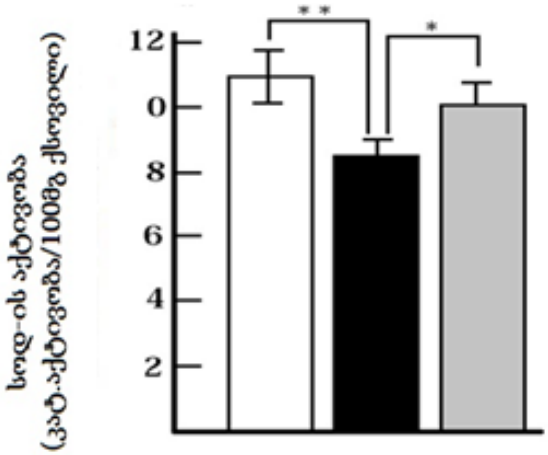


სურათი 12. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის ცვლილება სტრესირებული ვირთაგვებში ეგზოგენური კრეატინის შეყვანით

□-G1ჯგუფი(საკონტროლო); □-G2 ჯგუფი(სტრესირებული); ■- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი)

III.7. კრეატინის ეფექტი სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობაზე

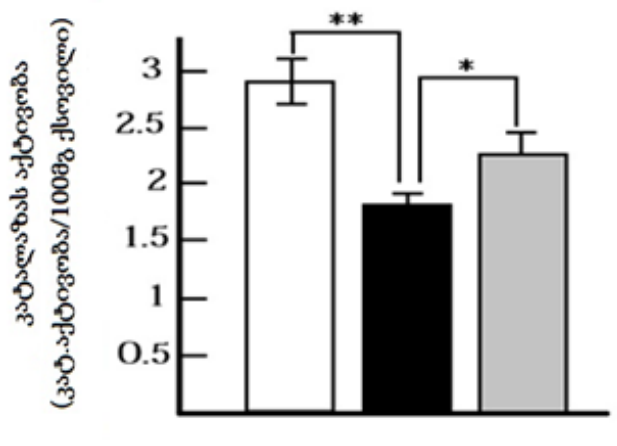
ექსპერიმენტის შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ საკვლევ ჯგუფებში ანტიოქსიდანტური სისტემის ისეთი ფერმენტების აქტივობა, როგორიცაა სუპეროქსიდდისმუტაზა (სოდ), კატალაზა და გლუტათიონრედუქტაზა. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 13, 14 და 15.



სურათი 13.ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობაზე

□-G1ჯგუფი (საკონტროლო); ■ -G2 ჯგუფი (30-დღიანი სტრესი);
▭- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი) .(*p<0.05, **p<0.001)

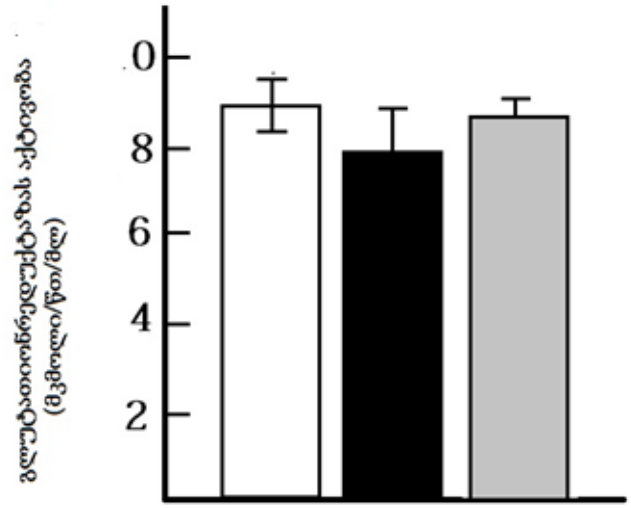
ორდინატთა ღერძზე – ფერმენტის აქტივობა, გამოსახული U/100mg ქსოვილზე



სურათი 14. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების კატალაზას აქტივობაზე

□-G1 ჯგუფი (საკონტროლო); ■-G2 ჯგუფი (30 დღიანი სტრესი); ▭- G3 ჯგუფი (სტრესირებული+ კრეატინი). (*p<0.05, **p<0.001)

ორდინატთა ღერძზე – ფერმენტის აქტივობა, გამოსახული U/mg ცილაზე



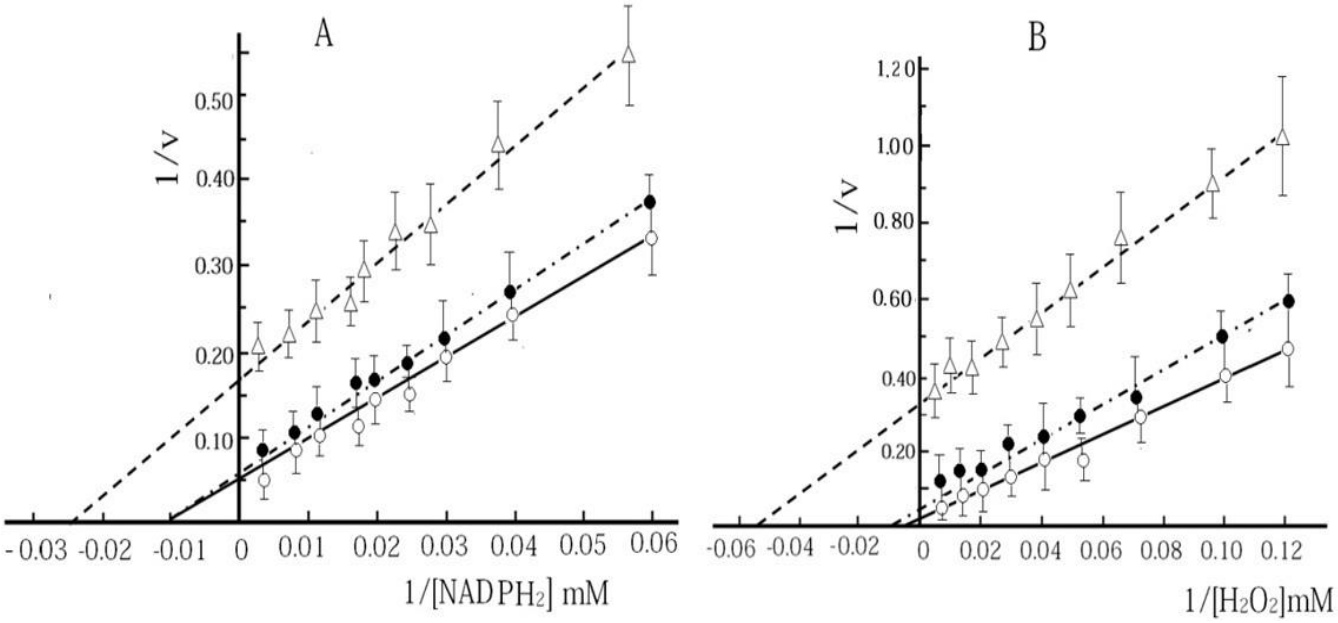
სურათი 15. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების ფერმენტ გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობაზე

□ -G1ჯგუფი(საკონტროლო); ■ -G2 ჯგუფი(30 -დღიანი სტრესი); ▭- G3 ჯგუფი (სტრესი + კრეატინი)

ორდინატთა ღერძზე – ფერმენტის აქტივობა, გამოსახული mkmol/min/ml

მიღებული მონაცემები აჩვენებენ, რომ ექსპერიმენტის 30-ე დღეს სტრესირებულ ვირთაგვებში (G2 ჯგუფი) სოდ-ის აქტივობა საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით სარწმუნოდაა შემცირებული (≈20%) , ხოლო G3 ჯგუფის ინდივიდების ჰიპოკამპში შეინიშნება ფერმენტის აქტივობის დაახლოებით 30%-იანი ზრდა (სურ. 13). მსგავსი ცვლილებებია ნანახი კატალაზას შემთხვევაშიც. კერძოდ, ხანგრძლივი სტრესის პირობებში ფერმენტული აქტივობა ≈40%-ით კლებულობს და სოდ-ის ანალოგიურად, კრეატინის შეყვანის პირობებში მიმდინარე ქრონიკული სტრესის პირობებში მისი აქტივობა სარწმუნოდაა მომატებული (სურ.14). სოდ-სა და კატალაზასაგან განსხვავებით, არ იქნა ნანახი სარწმუნო ცვლილება გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის შემთხვევაში (სურ. 15).

სოდ-სა და კატალაზას კინეტიკური მაჩვენებლების (V_{max}, K_m) შესწავლამ აჩვენა, რომ ხანგრძლივი იზოლაციისა და დღე-ღამური ციკლის დარღვევის პირობებში მიმდინარე სტრესის შემთხვევაში ადგილი აქვს ფერმენტების როგორც V_{max}-ის დაქვეითებას, ასევე K_m-სიდიდის გაზრდას. მიღებული მონაცემების ანალიზი გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ სტრესის პირობებში სოდ-ისა და კატალაზას აქტივობის დაქვეითების მიზეზს წარმოადგენს როგორც ფერმენტების რაოდენობრივი შემცირება, ასევე ფერმენტების თვისობის დაქვეითება შესაბამისი სუბსტრატების მიმართ (სურ. 16 A,B).

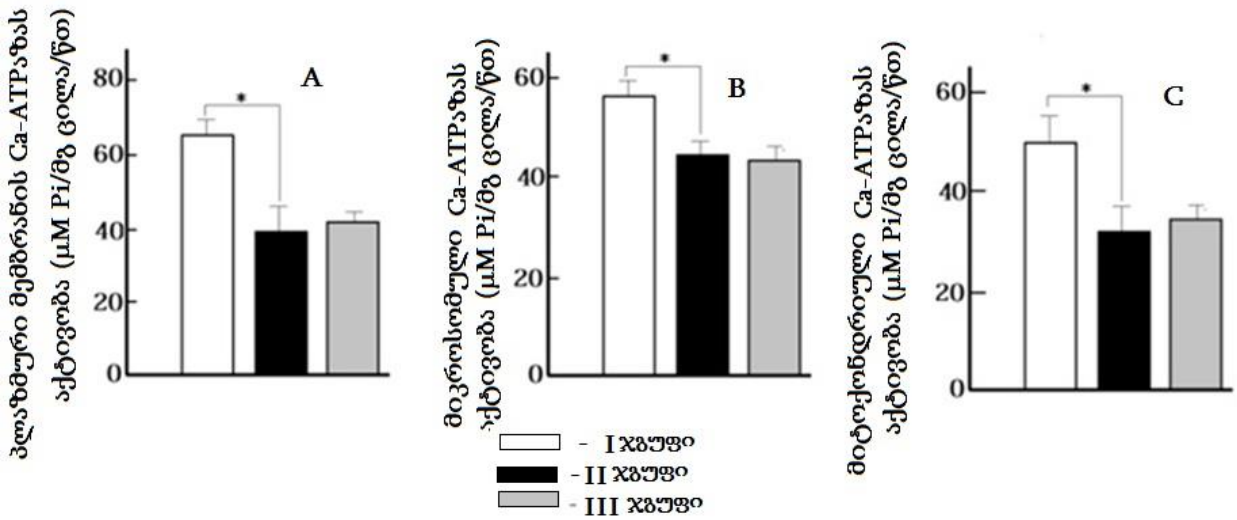


სურათი 16. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სოდ-ის (A) და კატალაზას (B) კინეტიკურ პარამეტრებზე (V_{max}, K_m)

○-G1 ჯგუფი(საკონტროლო); △-G2 ჯგუფი (30-დღიანი სტრესი); ●- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი).
ორდინატთა ღერძზე -(A) SOD-ის აქტივობა და (B) კატალაზას აქტივობის შებრუნებული სიდიდე (1/v)
აბსცისათან ღერძზე -(A) $NADH_2$(mkmol) და (B) H_2O_2-ის (mM) რაოდენობა

III.8. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის Ca^{2+}-ATPაზა-ს აქტივობაზე

იმის გათვალისწინებით, რომ უჯრედშიდა Ca^{2+}- ის შემცველობა რეგულირდება პლაზმური მემბრანის, ასევე მიკროსომული და მიტოქონდრიული Ca^{2+}-ATP-აზებით, შემდგომში განსაზღვრული იქნა ამ ფერმენტების აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევითა და იზოლაციით გამოწვეული სტრესის პირობებში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 17. ჩანს, რომ ამ პირობებში ადგილი აქვს მხოლოდ G2 ჯგუფის პლაზმური მემბრანის Ca^{2+}-ATPაზა-ს (PMCA) აქტივობის სარწმუნო დაქვეითებას, თუმცა ინდივიდებში, რომლებსაც 30 დღიანი სტრესის პირობებში ყოველდღიურად ინტრაპერიტონიალურად იღებდნენ კრეატინს, ეს მაჩვენებელი არ ეცვლებოდათ. რაც შეეხება ამ ფერმენტის მიკროსომულ და მიტოქონდრიულ იზოფორმებს, მათი აქტივობა არ დაფიქსირდა (სურ. 17 A,B,C).

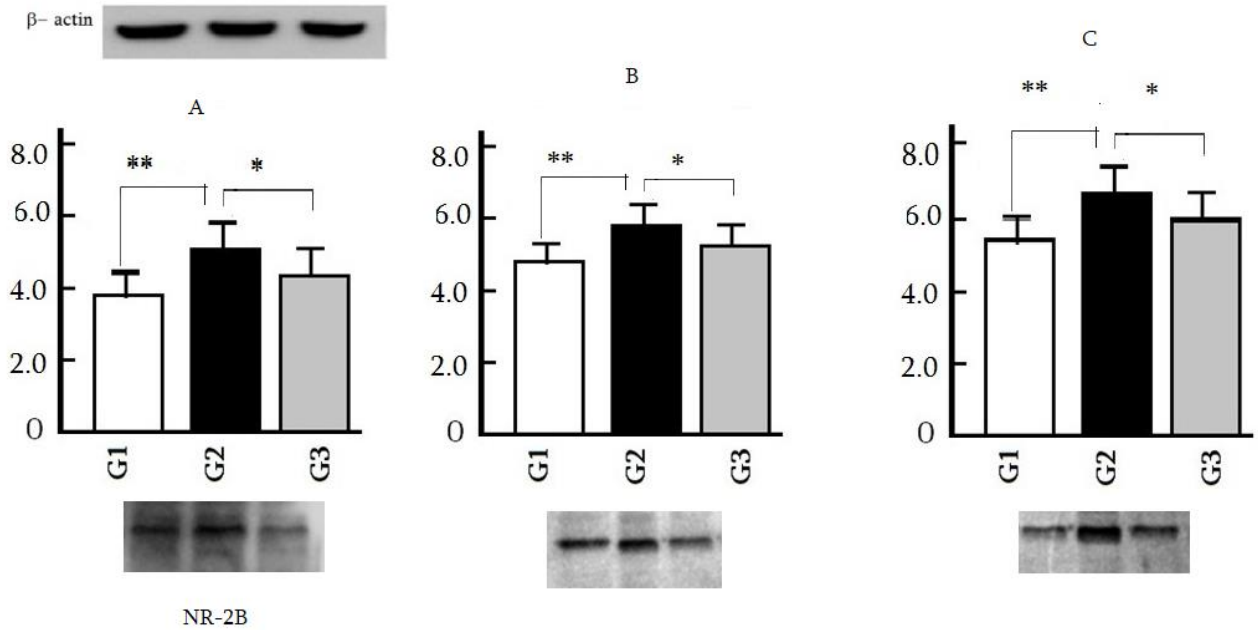


სურათზე 17. ქრონიკული სტრესის პირობებში პლაზმური მემბრანის (A) , მიკროსომული (B) და მიტოქონდრიული (C) Ca^{2+}ATPase-აზების აქტივობის ცვლილება ეგზოგენური კრეატინის შეყვანის პირობებში

ორდინატთა ღერძზე - ფერმენტის აქტივობა (μmol Pi/mg protein/min). (*$p < 0.05$)

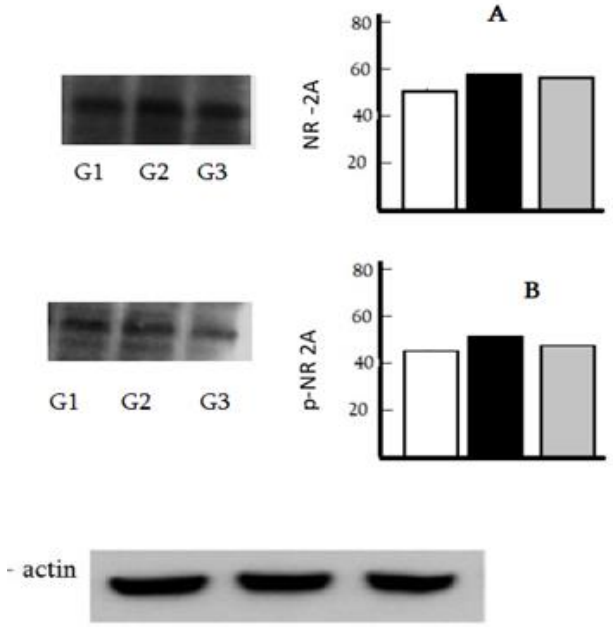
III.9. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა გლუტამატის NMDA-რეცეპტორისა და Na,K-ATPაზა-ს სუბერთეულების რაოდენობაზე და მათი ფოსფორილირების ხარისხზე

იმის გათვალიწინებით, რომ Ca^{2+}- ის რაოდენობრივ ცვლილებაზე გავლენას ახდენს გლუტამატის იონოტროპული NMDA-რეცეპტორი, შემდგომ ექსპერიმენტში, ჩვენს მიერ განსაზღვრულ იქნა ჰიპოკამპის უჯრედებში ამ რეცეპტორის სუბერთეულებისა და მათი ფოსფორილირებული ფორმების რაოდენობრივი შემცველობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევითა და იზოლაციით გამოწვეული სტრესის პირობებში. მიღებული შედეგებით დადგინდა, რომ NMDA რეცეპტორის NR-2A და NR-2B სუბერთეულებისა და მათი ფოსფორილირებული ფორმების ექსპრესიის ხარისხი არაერთგვაროვანია. კერძოდ, ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მომატებულია როგორც უშუალოდ NR- 2B სუბერთეულის, ასევე მისი ფოსფორილირებული იზოფორმების ექსპრესიის ხარისხი (სურ 20). რაც შეეხება რეცეპტორის NR -2A სუბერთეულს და მის ფოსფორილირებულ ფორმას p-NR -2A , ჩვენს ექსპერიმენტში სარწმუნო ცვლილებები ვერ იქნა ნანახი (სურ. 21)



სურათი 18 . NMDA **რეცეპტორის NR-2B** (A), **ფოსფორილირებული NR-2B (Ser1284** (B), **ფოსფორილირებული NR-2B (Tyr1070** (C), **რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი რაოდენობრივი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში**

G1 - საკონტროლო ჯგუფი; G2- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; G3 - ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილი ჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი. (**p<0.001, *p < 0.05)

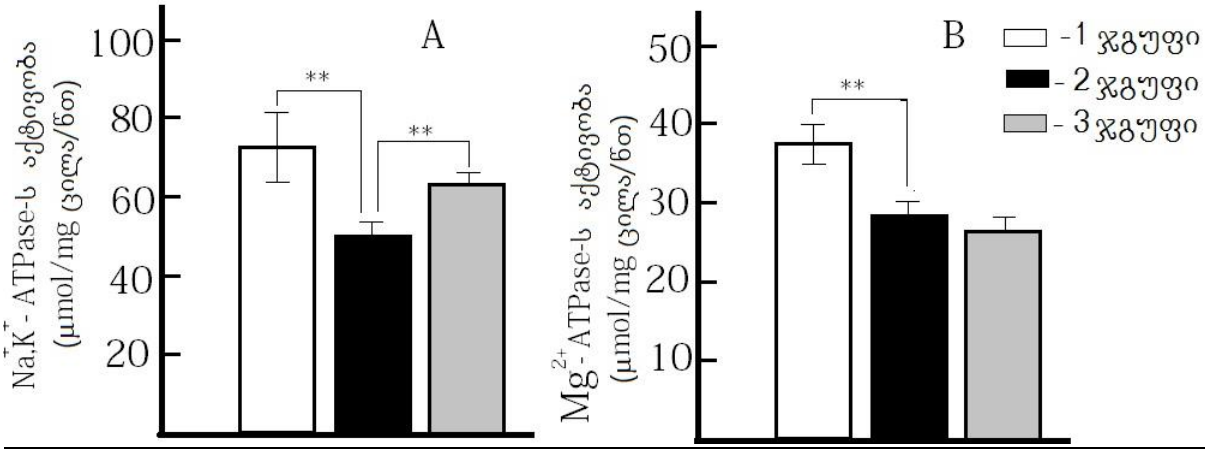


სურათი 19 . NMDA რეცეპტორის NR-2A (A), ფოსფორილირებული NR-2A (B), რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი რაოდენობრივი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

I - საკონტროლო ჯგუფი; II- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; III - ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილი ჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი.

იმის გათვალისწინებით, რომ NMDA რეცეპტორსა და Na^+/K^+-ATPაზას - ს შორის არის ფუნქციური და სტრუქტურული ურთიერთკავშირი, ჩვენი კვლევის შემდეგ ეტაპზე განვსაზღვრეთ, როგორც ამ Na^+/K^+-ATP-აზას აქტივობა (სურ.20 A), ასევე მისი სუბერთეულების რაოდენობრივი ცვლილებებიც. მიღებული შედეგები აჩვენებენ, რომ სოციალური იზოლაცია და ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევა დაახლოებით 40%-ით სარწმუნოდ ამცირებს მის აქტივობას და კრეატინის 30-დღის განმავლობაში ინტრაპერიტონიალური შეყვანა, Ca^{2+}-ATPაზა-გან განსხვავებით,

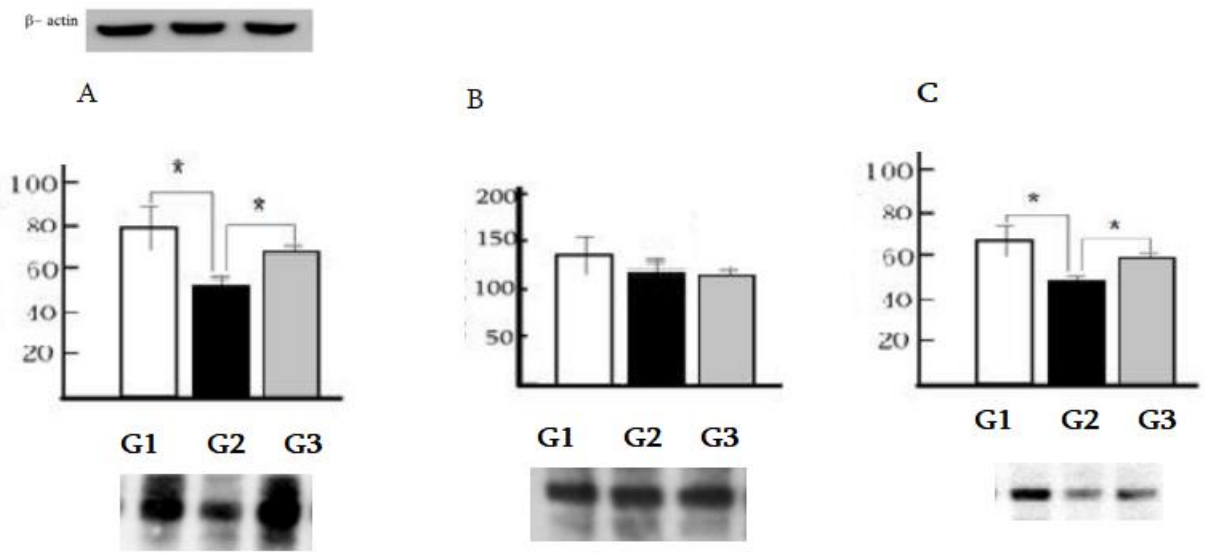
ზრდის მის აქტივობას. აღსანიშნავია, რომ Na,K-ATP-აზა-საგან განსხვავებით, კრეატინის ეფექტი ვერ იქნა ნანახი Mg^{2+}- ატფ-აზაზე (სურ. 20 B). კერძოდ სტრესი შედეგად დაქვეითებული ფერმენტული აქტივობა კრეატინის ყოველდღიური შეყვანის შედეგად პრაქტიკულად რჩება უცვლელი.



სურათზე 20. ქრონიკული სტრესის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედების Na, K-ATPase-სა და Mg^{2+} -ATPase-ის აქტივობის ცვლილება ეგზოგენური კრეატინის შეყვანის პირობებში

ორდინატთა ღერძზე - ფერმენტის აქტივობა (µmol Pi/mg protein/min), (**p<0.001)

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ 30-დღიანი სოციალური იზოლაციის პირობებში იცვლება არა მარტო ფერმენტის აქტივობა, არამედ ფერმენტის სუბერთეულების ექსპერიის ხარისხიც. კერძოდ, შეინიშნება Na^+/K^+-ATPაზა-ს α1 სუბერთეულის ექსპრესიის სარწმუნო შემცირება და ამის პარალელურად ადგილი აქვს α3-სუბერთეულის ექსპრესიის სარწმუნო გაზრდას, თუმცა α2-სუბერთეულის სარწმუნო ცვლილება ვერ იქნა ნანახი (სურ. 21).



სურ. 21. Na^+/K^+-ATPაზა -ს α1 (A), Na^+/K^+-ATPაზა -ს α2 (B), Na^+/K^+-ATPაზა -ს α3 (C) სუბერთეულების რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი რაოდენობრივი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

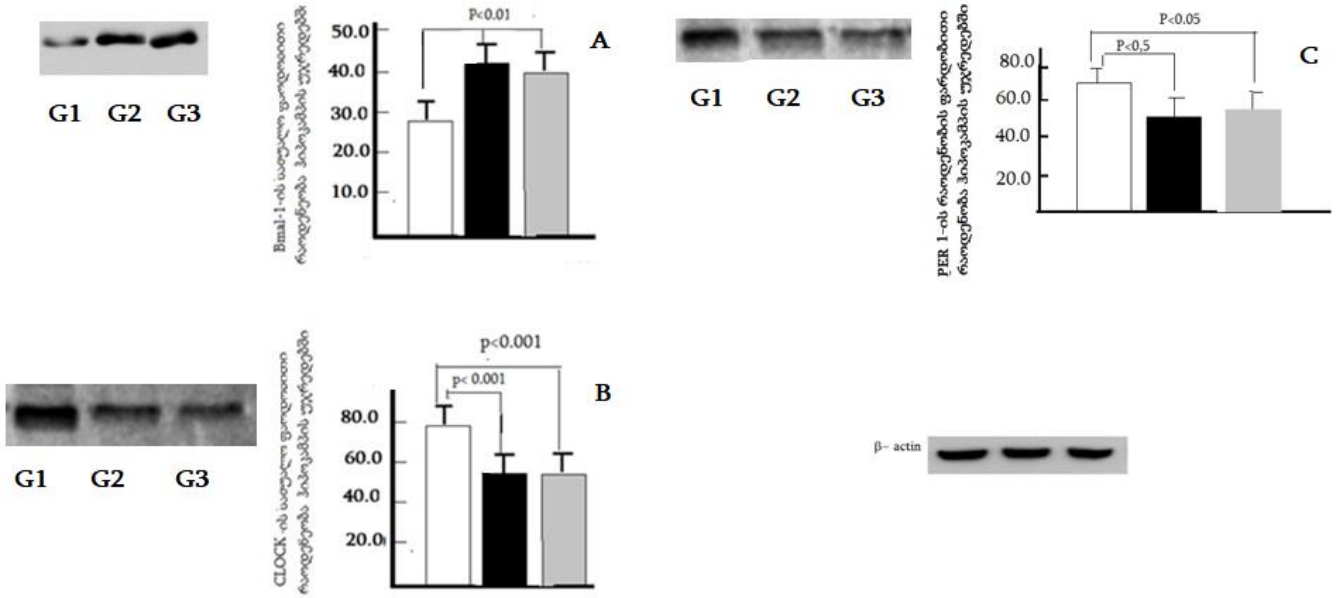
G1 - საკონტროლო ჯგუფი; G2- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; G3 - ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილი ჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი. ($*p < 0.05$)

ამდენად, მიღებული მონაცემებიდან გამომდინარე, შეიძლება ვთქვათ, რომ კრეატინისათვის დამახასიათბელია საკმაოდ მაღალი ანტიოქსიდანტური თვისება და ამის მიზეზი სტრესირებულ ვირთაგვებში იყო მისი მოქმედებით NMDA-რეცეპტორის აქტივობის დაქვეითებაა, რაც შესაბამისად ამცირებს სტრესის პირობებში გაზრდილი Ca2+-ის უჯრედშიდა შემცველობას და Na^+/K^+-ATPაზის აქტივობის გაზრდას.

III.10. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა საათის გენების რაოდენობაზე

ექსპერიმენტის შემდეგ ეტაპზე შესწავლილი იქნა საათი გენების ცილოვანი პროდუტების Bmal-1, clock, Per-1 რაოდნეობრივი ცვლილებები ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში და კრეატინის როლი ამ პროცესში.

მიღებული მონაცემებიდან, ჩანს რომ სტრესის პირობებში შეინიშნება BMAL-1-ის რაოდენობის მატება, თუმცა ეს მაჩვენებელი არ იცვლება G3 ჯგუფის ინდივიდებში, რაც მიუთითებს, რომ კრეატინის ეგზოგენური დამატება არ ცვლის ჰიპოკამპის უჯრედებში საათის გენების მიერ სინთეზირებული ტრანსკრიფციული ფაქტორების რაონდეობას (სურ. 22.A) განსხვავებული შედეგები მივიღეთ CLOCK-ის შემთხვევაში (სურ.22.B.). Bmal-1-ისაგან განსხვავებით, აღინიშნება მისი რაოდენობის სარწმუნო შემცირება. ამავე ტიპის ცვლილებებია ნანახი მესამე ჯგუფის ექსპერიმენტულ ცხოველებში. კერძოდ G3ჯგუფში კრეატინის ეგზოგენური მიწოდება არ ცვლის ტრანსკრიფციული ფაქტორის CLOC-K-ის რაოდენობრივ შემცველობას. რაც შეეხება, Per-1-ს, მისი რაოდენობა სტრესირებულ ცხოველებში მცირდება, ხოლო ეგზოგენური კრეატინი მიწოდება არ ცვლის მის შემცველობას. (სურ. 22.C).



სურ 22. საათის გენების პროდუქტების Bmal-1-ის (A), clock-ის (B), Per-1-ის (C) სუბერთეულების რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი რაოდენობრივი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

G1 - საკონტროლო ჯგუფი; G2- ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი; G3 - ცირკადული რიტმის დაღვევის პირობებში მყოფი ცხოველების ჯგუფი, რომლებსაც ყოველდღიურად შეყვანილი ჰქონდათ 140მგ/კგ-ზე კრეატინი.

თავი IV. მიღებული მონაცემების განხილვა

ცნობილია, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევა, რომელიც წარმოადგენს ერთ–ერთ გავრცელებულ სტრესს–ფაქტორს, დაკავშირებულია ინდივიდის კოგნიტურ და ქცევით დისფუნქციებთან, აგრესიულობასთან, მოძრაობითი და ორიენტაციული რეაქციების შემცირებასთან, მეხსიერების და დასწავლის გაუარესებასთან. ამის საფუძველს კი უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიური ცვლილებები წარმოადგენს, რაც აისახება ჰორმონალური სტატუსის ცვლილებით, ენერეგტიკული მეტაბოლიზმის ინტენსივობის შემცირებით, სინთეზის რეაქციების დაქვეითებით, ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობის ცვლილებით და სხვა. ყოველივე ამის გათვალისწინებით, აუცილებელია ისეთი ნაერთების მოძიება, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოხდინონ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია. ამ მიზნით მედიცინაში აქტიურად გამოიყენება რიგი ნივთიერებები და მათ შორის განიხილება კრეატინი. იგი აქტიურადაა ჩართული უჯრედების ენერგეტიკულ პროცესებში და გააჩნია ნეიროპროტექტორული და ნეირომოდულატორული თვისებები, თუმცა მისი მოქმედების მექანიზმი სრულად არ არის შესწავლილი.

აქედან გამომდინარე, კვლევის პირველ ეტაპზე ჩვენი მიზანს წარმოადგენდა 30 დღიანი ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში (0.5 სთ სინათლე/23.5სიბნელე) ექსპერიმეტულ ვირთაგვებში ქრონიკული სტრესის ჩამოყალიბების მონიტორიგი, რისთვისაც გამოვიყენეთ როგორც ფიზიოლოგიური, ასევე ბიოქიმიური ტესტები, რათა დაგვედგინა რამდენად ექვემდებარება ექსპერიმენტულ ცხოველებში სტრესის ჩამოყალიბება ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის ამ მოდელს. მიღებული მონაცემებიდან ჩანს, რომ არასტრესირებულ ცხოველებთან შედარებით ხანგრძლივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის შედეგად სტრესირებული ცხოველები ხასიათდებიან კვლევითი აქტივობის მაჩვენებლების კლებითა და შიშის რეაქციების რაოდენობის მატებით. ყოველივე ეს ცხოველების შფოთიანობისა და ემოციური დაძაბულობის გაზრდის მაჩვენებელია, რაც ემთხვევა ლიტერატურული მონაცემებს, ვინაიდან ემოციები - სტრესის აუცილებელი კომპონენტია. იგი განსაკუთრებით თვალშისაცემია ფსიქო–*ემოციური* სტრესი დროს. ხოლო კრეატინის ინტრაპერიტონალური შეყვანის

პირობებში ფიზიოლოგიური მაჩვენებლები უმჯობესდება, კერძოდ, აღინიშნება შიშის რეაქციების შემცირება და კვლებითი აქტივობების ზრდა.

ცნობილია, რომ სტრესის (ფიზიოლოგიური და ემოციური) ფორმირების გამშვებ მექანიზმს წარმოადგენს დარღვევები ნერვულ და ენდოკრინულ სისტემაში, რაც გამოწვეულია მათი ფუნქციონირების რეგულირებაში მიმდინარე ცვლილებებით. აქედან გამომდინარე, კვლევის შემდგომ ეტაპზე სტრესის მონიტორინგისათვის განვსაზღვრეთ ჰორმონების, კერძოდ მელატონინის, კორტიკოსტერონის, სეროტონინის, დოფამინის, ნორადრენალინისა და ადრენალინის რაოდენობრივი ცვლილებები. ცნობილია, რომ ორგანიზმის „ ცირკადული საათის“ ნორმალურ ფუნქციონირებაზე პასუხისმგებელია ჰორმონი მელატონინი, რომელიც სინთეზდება ეპიფიზში სიბნელის პირობებში. ჩვენს მიერ მიღებული შდეგბიდანაც ჩანს, რომ მელატონინის შემცველობა სტრესირებულ ცხოველებში მომატებულია, მაშინ როდესაც ეგზოგენური კრატინის მიწოდებისას ეს მაჩვენებელი სარწმუნოდ მცირდება. სტრესის შედეგად გამოწვეული ჰორმონალური დისბალანსს კი შეუძლია გამოიწვიოს ჰიპოკამპის დაზიანება, რაც, თავის მხრივ, გავლენას ახდენს ფსიქო–ემოციურ სტატუსზე და მეხსიერებაზე. რაც შეეხება კორტიკოსტერონსა და სეროტონინს აღმოჩნდა რომ, კორტიკოსტერონის რაოდენობა სტრესირებულ ცხოველებში მცირდება, განსხვავებისთ სეროტონინისაგან. ეს უკანასკნელის სისხლის პლაზმაში იზრდება, თუმცა სტრესის ფორმებიდან გამომდინარე მათი შემცველობა იცვლება. ლიტერატურული მონაცემებიდან გამომდინარე მწვავე სტრესისას ადგილი აქვს კორტიკოსტერონის რაოდენობის მომატებას და სეროტონინის კლებას, მაშინ, როცა ქრონიკული სტრესის დროს საპირისპირო მონაცემები ფიქსირდება.

სტრესორების ზემოქმედების დაწყებით მაჩვენებელს ასევე წარმოდგენს სიმპატო-ადრენერგული სისტემის აქტივაცია, რაც ვლინდება სისხლში კატექოლამინების (ნორადრენალინი, ადრენალინი) რაოდენობრივი მატებით. როგორც ცნობილია, ადრენალინს ძირითადად წარმოადგენს თირკმელზედა ჯირკვლის ჰორმონს, ხოლო ნორადრენალინი ძირითადად წარმოიქმნება სიმპატიკური ნერვული დაბოლოებებიდან. მათი რაოდენობრივი ცვლილებები სისხლში ახასიათებს სიმპათო-ადრენოსიმპატიკური სისტემის ჰორმონალურ და

მედიატორულ ჯაჭვს. კატაქოლამინები, როგორც ცნობილია, წარმოადგენენ ორგანიზმის ადაპტური რეაქციების უმნიშვნელოვანეს რეგულატორებს. ისინი უზრუნველყოფენ ორგანიზმის სწრაფ გადასვლას მოსვენებული მდგომარეობიდან აგზნებულ მდგომარეობაში და სწორედ კატექოლამინური რეაქცია წარმოადგენს მნიშვნელოვან ელემენტს სტრესული მდგომარეობის ფორმირების პროცესში, მათ შორის ემოციური სტრესის პირობებში. აღსანიშნავია, რომ სტრესის სწრაფი აქტივაციის ფაზა განპირობებულია ნორადრენალინის გამოთავისუფლებით ჰიპოთალამუსისა და ნერვული სისტემის სხვა განყოფილებების მიერ, თუმცა სტრესის გახანგრძლივებას მოსდევს მისი შემცველობის კლება. ანალოგიური მდგომარეობაა ადრენალინის შემთხვევაშიც. კერძოდ, მისი რაოდენობრივი მაჩვენებელი დამოკიდებულია სტრესის ფორმაზე. ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტის შედეგებიდან ჩანს 30-დღიანი ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ცხოველების სისხლში ნორადრენალინის რაოდენობის სარწმუნო შემცირება, რაც მიუთითებს, რომ ამ პირობებში ადგილი აქვს თირკმელზედა ჯირკვალში მისი სინთეზის ინტენსივობის დაქვეითებას, რაც თავის მხრივ, შესაძლებელია გამოწვეული იყოს სტრესის შედეგად ჯირკვლის ტვინოვანი შრის უჯრედებში მეტაბოლური პროცესების ინტენსივობის შემცირებით. ვარაუდს ადასტურებს ცდები, სადაც შესწავლილია ხანგრძლივი იზოლაციიით გამოწვეული სტრესის პირობებში ინტრაპერიტონიალურად შეყვანილი კრეატინის გავლენა ნორადრენალინის შემცველობაზე. როგორც ცნობილია, კრეატინი, რომელიც აქტიურადაა ჩართული უჯრედის ენერგიით უზრუნველყოფის პროცესში, მნიშვნელოვან ენდოგენურ ნაერთს წარმოადგენს. ამავე დროს სტრესის მიმდინარეობისას მისი ეგზოგენური შეყვანა ორგანიზმში აუმჯობესებს სტრესის შედეგად დაზიანებული უჯრედების მდგომარეობას და ასევე იცავს მას გააქტივებული ოქსიდაციური პროცესებისაგან. ანალოგიური შედეგები იქნა მიღებული ადრენალინის შემთვევაშიც. სისხლში აღინიშნება ადრენალინის რაოდენობის მკვეთრი შემცირება, რაც ასევე მიანიშნებს თირკმელზედა ჯირკვალში ოქსიდაციური პროცესების განვითარებას და იქ მიმდინარე სინთეზური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითებას. ეს მოსაზრება ასევე დასტურდება ხანგრძლივი სტრესის პარალელურად ორგანიზმში ეგზოგენური კრეატინის შეყვანის შემთხვევაში სისხლში ადრენალინის რაოდენობის სარწმუნო

ზრდით. ცდების შემდგომ ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციითა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ქრონიკული სტრესის პირობებში კატექოლამინის დოფამინის რაოდენობრივი ცვლილებებიც. სისხლში მისი რაოდენობა საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით სტრესირებულ ცხოველებში გაცილებით მაღალია, რაც მიუთითებს, რომ დოფამინის შემცველობა მწვავე და ქრონიკული სტრესის პირობებში არაერთგვაროვნად იცვლება.

ცნობილია, რომ სხვადასხვა ტიპის სტრესული ფაქტორების ზემოქმედებით გაძლიერებული ოქსიდაციური პროცესების შედეგად მომატებული ROS-ების პირველადი სამიზნე მიტოქონდრიული, ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართული ფერმენტებია, რაც მათ მოლეკულებში არსებული სპეციფიკური სტრუქტურებითაა განპირობებული. მაგალითად, აკონიტაზასა და სუქცინატდეჰიდროგენაზას მოლეკულში არსებული Fe-S ცენტრები გამოირჩევიან ოქსიდაციური პროცესებისადმი სენსიტიურობით და გამოიყენებიან როგორც ამ პროცესების მგრძნობიარე მარკერები[21]. მიღებული მონაცემებიდან ჩანს, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში კონტროლთან (IG) შედარებით სარწმუნოდაა შემცირებული როგორც სუქცინატდეჰიდროგენაზას, ასევე აკონიტაზას აქტივობა (სურ.5 A, C). შეინიშნება α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას აქტივობის დაქვეითებაც, რომელიც ასევე ამჟღავნებს მგრძნობელობას ოქსიდაციური სტრესისადმი (სურ.5 B) [110]. ანალოგიური ცვლილებებით ხასიათდება კრეატინკინაზაც, რომლის მოლეკულში არსებული SH-ჯგუფების დაჟანგვა ასევე ამცირებს მის აქტივობას (სურ.5 E). ამის საპირისპიროდ, ფუმარაზას მოლეკულაში არ გვხვდება ამ ტიპის სტრუქტურები, რის გამოც იგი გამოირჩევა არასენსიტიურობით ამ პროცესებისადმი[36]. სურათი 5 D-ზე წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებს, რომ ამ პირობებში არ შეინიშნება ფუმარაზას აქტივობის ცვლილება. მიღებული შედეგებიდან ასევე ჩანს, რომ Cr-ის ეგზოგენური მიწოდება სარწმუნოდ ზრდის მათ აქტივობას.

ამ ფერენტების შემცირების პარალელურად შეინიშნება გლიკოლიზის პროცესის გაძლიერება. ცნობილია, რომ გლიკოლიზური პროცესების გაძლიერებას უჯრედში თან სდევს ლაქტატის რაოდენობის მატებაც, რაც თავის მხრივ, უჯრედის შემჟავიანების მიზეზი ხდება, რაც ხელს უწყობს ოქსიდაციური სტრესის შედეგად

ინჰიბირებული ფერმენტების აქტივობის დაქვეითების ხარისხის ზრდას[53]. ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში გლიკოლიზის გააქტიურების მაჩვენებელია ალდოლაზასა და ჰექსოკინაზას აქტივობის ზრდა (სურ.5 F,G). ცნობილია, რომ ჰექსოკინაზა უჯრედში მიტოქონდირული და სოლუბილიზირებული ფორმითაა წარმოდგენილი. მიტოქონდრიული ჰექსოკინაზას მაღალი აქტივობით გამოირჩევა ნერვული უჯრედები. ისეთ პირობებში, როცა ატფ-ის რაოდენობა უჯრედში შემცირებულია, ფერმენტი უკავშირდება რა Mg^{2+}-ს, ასოცირდება მიტოქონდრიულ გარე მემბრანასთან, რაც იწვევს გლიკოლიზური პროცესების გააქტივებას. ეს პროცესი განსაკუთრებით ინტენსიურად მიმდინარეობს ატფ-ის და შესაბამისად ATP/ADP დაბალი მაჩვენებლის პირობებში, მაგალითად, ქრონიკული სტრესის შემთვევაში. სავარაუდოა, რომ იმ პირობებში, როცა ჰიპოკამპის უჯრედებში კრეატინის ეგზოგენური მიწოდებისას გაზრდილია ATP-ის და ასევე ATP/ADP მაჩვენებელი, იზრდება ჰექსოკინაზას სოლუბილიზაციის ხარისხი, რასაც თან სდევს გლუკოზის ფოსფორილირების დაქვეითება და შესაბამისად, გლიკოლიზის პროცესის შეფერხებაც [50]. ამრიგად, ჩვენი კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევისას ადგილი აქვს მიტოქონდრიული, ენერგეტიკულ პროცესებში მონაწილე ფერმენტების აქტივობისა და შესაბამისად ამ პროცესის ინტენსივობის დაქვეითებას, რაც თავის მხრივ, განაპირობებს გლიკოლიზის, როგორც ენერგეტიკული ბალანსის კომპენსატორული მექანიზმის გაძლიერებას ჰიპოკამპის უჯრედებში.

ცნობილია, რომ ზოგადად, ფერმენტის აქტივობის ცვლილების მიზეზი შესაძლებელია იყოს როგორც მათი სტრუქტურული, ასევე რაოდენობრივი ცვლილებები. ამის გათვალისწინებით, საინტერესოს წარმოადგენდა გაგვერკვია კრეატინის ინტრაპერიტონიალურად მიწოდების პირობებში ფერმენტების აქტივობის ცვლილების ხასიათი. ეს საკითხი შესწავლილი იქნა კრეატინკინაზას კინეტიკური მახასიათებლების (V_{max}, Km) ცვლილების მაგალითზე. სურათზე 6 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებს, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში განვითარებული ოქსიდაციური სტრესის პირობებში მცირდება როგორც რეაქციის V_{max}, ასევე იცვლება Km სუბსტრატებისადმი, რაც ფერმენტის როგორც რაოდენობის შემცირების, ასევე მისი სტრუქტურული ცვლილებების მაჩვენებელია. თუმცა ასევე

ჩანს, რომ სტრესის პირობებში Cr-ის ეგზოგენური შეყვანა ზრდის ფერმენტის აქტივობას V_{max}-ის გაზრდის ხარჯზე, რისი მიზეზიც, სავარაუდოდ Cr-ის შეყვანის შემთხვევაში სინთეზური რეაქციების და შესაბამისად, კრეატინკინაზას რაოდენობის მატება უნდა იყო. ანალოგიური შედეგებია ნანახი სხვა კვლევებშიც, სადაც გამოთქმულია მოსაზრება, რომ Cr-ის ეფექტი ფერმენტების აქტივობაზე უკავშირებს მის მონაწილეობას უჯრედის ენერგეტიკული პოტენციალისა და შესაბამისად, ანაბოლური პროცესების ინტენსივობის ზრდას და ხელს უწყობს სხვადასხვა ცილების, მათ შორის ფერმენტების რაოდენობის მატებასაც [10; 51]. თუმცა არსებობს განსხვავებული მოსაზრებაც, რომ ამის მიზეზია Cr-ის თვისება, მოახდინოს რეაქტიური რადიკალების შებოჭვა და განეიტრალება და ამ გზით იმოქმედოს ფერმენტების აქტივობაზე. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემები მიუთითებენ, რომ კრეატინკინაზას აქტივობის ზრდა ეგზოგენური Cr-ის მიწოდების პირობებში გამოწვეული უნდა იყოს სინთეზური რეაქციების ინტენსივობის გაზრდით[52]. ამრიგად, სავარაუდოა, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში Cr-ის მიწოდება უზრუნველყოფს ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართული მიტოქონდრიული ფერმენტების აქტივობის მატებას მათი სინთეზის ინტენსივობის გაზრდით.

ამ მოსაზრებას ადასტურებს ექსპერიმენტი, სადაც შესწავლილია ცილის სინთეზის ინტენსივობა როგორც ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის, ასევე ამ პირობებში ეგზოგენური Cr-ის მიწოდებისას. ჩვენი ყურადღება მიიპყრო PI3K/ AKT /mTOR სასიგნალო გზამ, რომელიც ითვლება უჯრედული მეტაბოლიზმის უნივერსალურ სასიგნალო გზად. მის ცენტრალურ კომპონენტად ითვლება ფერმენტი ფოსფატიდილინოზიტიდ - 3-კინაზა (PI3K), AKT და mTOR. ცნობილია, რომ ეს გზა მონაწილეობს ისეთ მნიშვნელოვან უჯრედულ პროცეებში, როგორიცა აპოპტოზი, მეტაბოლიზმი, პროლიფერაცია და სხვ. ამ გზის პირველ კომპონენტს წრმოადგენს PI3K -ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზა. როგორც ცნობილია, ეს ფერმენტი 3 კლასითაა წარმოდგენილი. აქედან საინტერესოს წარმოდგენს 1 კლასის PI3K. ეს ფერმენტი ორ სუბერთეულს შეიცავს. ესენია კატალიზური და რეგულატორული სუბერთეულები, რომლებიც თავის მხრივ რადენიმე იზოფორმითაა წრმოდგენილი [52]. კატალიზური სუბერთეულებიდან ჩვენი ყურადღება მიიპყრო p110α, ვინაიდან

ნერვულ ქსოვილში სწორედ ეს სუბერთული გვხვდება დიდი რაოდენობით. სურათზე 7 წარმოდგენილია PI3K -p110α სწორედ ეს რაოდენობრივი ცვლილებები ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში განვითარებული სტრესის დროს და კრეატინის გავლენა ამ პროცესზე. როგორც სურათიან ჩანს, G2 კლასის ინდივიდების ჰიპოკამპის უჯრედებში აღინიშნება PI3K -p110α ორ რაოდენობრივი შემცირება, თუმცა სტრესის პარალელურად კრეატინის ინტრაპერიტონიალური მიწოდების პირობებში მისი რაოდენობა სარწმუნოდ მატულობს. PI3K -p110α-გან განსხვავებით, ვერ იქნა ნანახი როდენობრივი ცვლილებები რეგულატორული სუბერთეულის (p85) შემთხვევაში.

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, შემდგომ ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა სერინ-ტრეონინ კინაზური აქტივობის მქონე რაპამიცინის სამიზნე ცილა mTOR-მა, რომელიც ითვლება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და სინთეზური რეაქციების ძირითად რეგულატორად [42]. იგი ორი ცილოვანი კომპლექსის mTORC1-სა და mTORC2-ის შემადგენლობაში გვხვდება. mTORC1 ძირითადად ციტოპლაზმაშია ლოკალიზირებული, სადაც ასოცირებულია ლიზოსომურ მემბრანასთან და ცილის სინთეზის ძირითადი რეგულატორის ფუნქციას ასრულებს, ხოლო mTORC2 წარმოადგენს სერინ-ტრეონინკინაზური აქტივობის მქონე AKT /პროტეინინაზა B -ს აქტივატორს. ჩვენი მონაცემებიდან ჩანს, რომ ჰიპოკამპის უჯრედებში ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში შეინიშნება როგორც საერთო, ასევე ფოსფორილირებული mTOR-ის რაოდენობის შემცირება (სურ.8 A,B). აღსანიშნავია, რომ mTOR-ის აქტივობა განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის ფუნქციონირებისათვის. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ mTOR-ის ინჰიბირებას მოსდევს მოტოქონდრიული პროცესების დაქვეითება და ამის საპირისპიროდ, გლიკოლიზური პროცესების გაძლიერება, რაც გამოჩნდა ჩვენს ექსპერიმენტშიც (სურ. 5).

ცნობილია, რომ mTOR-ის აქტივობა უჯრედში რეგულირდება როგორც უარყოფითი, ასევე დადებითი რეგულატორებით. უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს კომპლექსი TSC1/2 (tuberous sclerosis complex ½), რომელსაც შესწევს უნარი მოახდინოს mTORC1-ის აქტივობის ცვლილება. TSC1/2-ის ბლოკატორად

ითვლება AKT/PKB, ხოლო გააქტივება სხვადასხვა ფაქტორით ხდება. ამ ფაქტორებს შორისაა უჯრედში ROS-ის რაოდენობის მატებაც. აღსანიშნავია, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში ოქსიდაციური პროცესის გააქტიურება და ROS-ის რაოდენობრივი მატება ასევე ნანახია ჩვენს მიერაც, რაც თავის მხრივ, TSC1/2 კომპლექსის აქტივაციის და ფოსფორილირებული mTOR-ის შემცირების მიზეზი შეიძლება გახდეს. mTOR-ის უარყოფით რეგულატორად ითვლება ასევე უჯრედში ატფ-ის შეცველობა, რომლის დაქვეითება ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევისას ასევე დასტურდება ჩვენი წინა კვლევებითაც. თავის მხრივ, TSC1/2 კომპლექსის სამიზნეს წარმოადგენს GTP-აზური აქტივობის მქონე ცილა Rheb. ჩვეულებრივ მდგომარეობაში, როცა TSC1/2 კომპლექსი არააქტიურია, Rheb-ს აქვს საშუალება გააქტიუროს ლიზოსომურ მემბრანასთან ასოცირებული mTORC1. სწორედ TSC1 კომპლექსის გააქტიურება იწვევს mTORC1-ის დისოციაციას ლიზოსომებიდან და შესაბამისად, მისი აქტივობის შემცირებას.

AKT, რომელიც mTOR-ის დადებით აქტივატორია, თავის მხრივ, ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზას (PI3K) სამიზნეა. ცნობილია, რომ IP3K/AT/mTOR სასიგნალო გზის აქტივობა სხვადასხვა უჯრედგარე სიგნალებით იცვლება, მათ შორის განიხილება ასევე სტრესული ფაქტორებიც. ჩვენი მონაცემებით დასტურდება, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, როცა ადგილი აქვს ჟანგითი ფოსფორილირებისა და შესაბამისად ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა დაქვეითებას, აღინიშნება ფოსფორილირებული AKT-ს რაოდენობის შემცირება (სურ.8 C,D). ითვლება, რომ AKT-ს აქტივობის რეგულირებაში ჩართულია ცილა PTEN, რომელიც PI3K -გან განსხვავებით, ამ ფერმენტის უარყოფითი რეგულატორია და მისი გააქტიურება იწვევს AKT-ს დეფოსფორილირებას და შესაბამისად, აქტივობის შემცირებას. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებით დასტურდება ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში სწორედ ცილა PTEN-ის აქტივაცია. ცნობილია მთელი რიგი ფაქტორები, რომლებიც PTEN-ის გააქტიურებას იწვევს. ასეთია, მაგალითად, NMDA-რეცეპტორის აქტივაციით განპირობებული უჯრედში Ca^{2+}-ის რაოდენობის მატება [22].

მიღებული მონაცემების გათვალისწინებით სავარაუდოა, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში მიმდინარე

PI3K/AKT/ mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტების აქტივობის ცვლილების სავარაუდო მიზეზი შესაძლებელია იყოს უჯრედში Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილებები, რასაც მოსდევს PTEN-ის გააქტიურება და შესაბამისად, AKT-სა და mTOR-ის აქტივობის შემცირება.

ჩვენს მიერ მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ ექსპერიმენტულ ცხოველებში სტრესის პირობებში ეგზოგენური კრეატინის ყოველდღიური მიღება არა მარტო აუმჯობესებს დაქვეითებულ ენერგეტიკულ პოტენციალს, არამედ მას გააჩნია პროტექტორული ეფექტიც. წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, რომ კრეატინის ეგზოგენურად მიწოდების პირობებში (III G) ჰიპოკამპის უჯრედებში, სტრესირებული ცხოველების ჰიპოკამპთან შედარებით (IIG) აქტიური PTEN-ის რაოდენობის შემცირების ფონზე გაზრდილია როგორც საერთო, ასევე აქტივირებული AKT-ს რაოდენობა (სურ.8 A, B).

მიღებული მონაცემების გათვალისწინებით, ამის შესაძლო მიზეზს წარმოადგენს Cr-ის მოდულატორული ეფექტი NMDA-რეცეპტორზე, რასაც მოსდევს ჰიპოკამპის უჯრედებში როგორც Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი, ასევე ცილა PTEN-ის აქტივაციის ხარისხის ცვლილება, რაც თავის მხრივ AKT-სა და mTOR-ის გააქტიურებისა და შესაბამისად, ჰიპოკამპის უჯრედებში ცილის სინთეზის (მათ შორის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების) ინტენსივობისა და შესაბამისად, ამ სისტემის ფერმენტების ფერმენტების აქტივობის მატების მიზეზი ხდება.

ამ მოსაზრებას ადასტურებს ცდები, სადაც შესწავლილია აქტივირებული რიბოსომული S6K-ს რაოდენობის მაგალითზე ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ცილის სინთეზის მიმდინარეობა და მისი ცვლილება Cr-ის ეგზოგენურად მიწოდების პირობებში. ცნობილია, რომ ამ ფერმენტის აქტივობა პირდაპირაა დამოკიდებული mTOR-ით მის ფოსფორილირებაზე და იცვლება როგორც მწვავე, ასევე ქრონიკული სტრესის პირობებში. მონაცემებიდან ჩანს, რომ IIG-ის ჰიპოკამპის უჯრედებში, აქტივირებული mTOR-ის შემცირების პარალელურად, დაქვეითებულია ასევე ფოსფორილირებული რიბოსომული S6K-ს რაოდენობაც. ამის საპირისპიროდ, IIIG-ში ეს სიდიდე გაზრდილია, რაც ცილის სინთეზის ინტენსივობის გაზრდის მაჩვენებელია (სურ 10. A).

ამ მოსაზრებას განამტკიცებს ასევე ექსპერიმენტი, სადაც შესწავლილია აქტივირებული ტრანსკრიფციული რეპრესორის 4E-BP-1-ს რაოდენობრივი ცვლილებები საკვლევ ჯგუფებში (სურ.10 B). ცნობილია, რომ mTOR-ზე დამოკიდებული ფოსფორილირება იწვევს არა მარტო S6K-ს აქტივაციას, არამედ ეუკარიოტული ტრანსლაციის ინჰიბიტორის 4E-BP1-ს ინჰიბიციასაც, რომელიც წარმოადგენს ცილის სინთეზის პროცესის შემაფერხებელ ფაქტორს და მისი აქტივობის ზრდა უკავშირდება ცილის სინთეზის ინტენსივობის შემცირებას [67; 69]. სურათიდან ჩანს, რომ კრეატინის ეგზოგენური მიწოდების შემთხვევაში სტრესირებული ჯგუფის უჯრედებთან შედარებით, შეინიშნება ამ ფაქტორის აქტივირებული ფორმის რაოდნეობრივი შემცირება, რაც ცილების სინთეზის ინტენსივობის გაზრდის მაჩვენებელია(სურ. 10 B). .

თუმცა, შესაძლებელია ასევე ეგზოგენური Cr-ის მიწოდებისას ადგილი ჰქონდეს თავის ტვინში თავისუფალი ამინომჟავების ტრანსპორტირების გაძლიერებასაც, რაც თავის მხრივ, ცილის სინთეზის ინტენსივობის გაზრდის მიზეზი ხდება, როგორც ამას ზოგიერთი ავტორი ვარაუდობს.

ამდენად, მიღებული მონაცემებიდან იკვეთება, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში აღინიშნება PI3K /AKT/PKB /mTOR სასიგნალო გზის აქტივობის შეფერხება, რაც სავარაუდოდ გამოწვეული უნდა იყოს ამ პირობებში განვითარებული ოქსიდაციური სტრესის შედეგად NMDA-რეცეპტორის ჰიპერაქტივაციითა და Ca^{2+}-ის სიჭარბით, რაც PTEN-ის გააქტიურებასა და AKT-სა და შესაბამისად, mTOR-ის აქტივაციის შემცირებას იწვევს და აისახება ზოგადად ცილების სინთეზის პროცესის, მათ შორის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების რაოდენობრივ შემცირებაში. კრეატინის მოდულატორული ეფექტის გათვალისწინებით NMDA-რეცეპტორის აქტივობის ნორმალიზაციის პროცესში, სავარაუდოა რომ ეგზოგენური კრეატინის დამატება, გარდა ენერგეტიკული პოტენციალის გაზრდისა, იწვევს ასევე PI3K /AKT/PKB /mTOR სასიგნალო გზის გააქტიურებასა და ზოგადად ცილის სინთეზის, მათ შორის მიტოქონდრიული, ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში და ანტიქოსიდანტურ პროცესებში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის ცვლილებასაც.

ცნობილია, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციითა და ცირკადული რიტმის დარღვეით გამოწვეულ ქრონიკულ სტრესს თავის ტვინში თან ახლავს ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბება. იმ რადიკალებს შორის, რომელებიც ოქსიდაციური პროცესების განვითარების მიზეზი ხდება, მნიშვნელოვანია პეროქსიდნიტრიტი ($ONOO^-$) და სუპეროქსიდი. ცნობილია, რომ პეროქსიდნიტრიტის ძირითად წყაროს აზოტის ჟანგის (NO) წამოადგენს. ამ პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში NO-ს მატება ნანახია როგორც ჩვენს წინა კვლევებშიც, ასევე სხვა ავტორების მიერაც [22; 40; 56; 73]. მე-12 სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ NO-ს ჭარბი რაოდენობა სარწმუნოდაა შემცირებული G3 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში. ცხრილიდან ასევე ჩანს, რომ კრეატინის ხანგრძლივი პერიოდით ინტრაპერიტონიალური მიწოდება არ ცვლის სტრესის პირობებში გაზრდილი H_2O_2-ს რაოდენობას. ცნობილია, რომ H_2O_2 მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედის ჰომეოსტაზში, მონაწილეობს რა გენების ექსპრესიაში, მათ შორის ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების სინთეზშიც [61]. აღსანიშნავია, რომ ანალოგიური მონაცემებია მიღებული სხვა მკვლევარების მიერაც [8; 75], რაც იძლევა საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ კრეატინის ეფექტი ანტიოქსიდანტურ სისტემაზე შერჩვითი ხასიათისაა და დამოკიდებულია აქტიური რადიკალის კონკრეტულ ფუნქციაზე უჯრედში.

როგორც ცნობილია, ფერმენტ NO-სინთაზას აქტივატორს წარმოადგენს Ca^{2+} [129]. ამის გათვალისწინებით, შემდგომში შესწავლილი იქნა Ca^{2+} -ის იონის რაოდენობრივი ცვლილებები სამივე ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ 2 ჯგუფის უჯრედებში სარწმუნოდ იზრდება Ca^{2+}-ის შემცველობა (სურ.11), რაც ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს, რომლებიც ადასტურებენ ხანგრძლივი ქრონიკული სტრესის დროს Ca^{2+}-ის რაოდენობის ზრდას [33; 80]. სურათ 11-ზე წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებენ, G3 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში Ca^{2+}-ის რაოდენობა საკონტროლო მაჩვენებლის ფარგლებშია. აღსანიშნავია, რომ კრეატინის ანალოგიური გავლენა Ca^{2+}ის რაოდენობაზე ნანახია ჩონჩხი კუნთებშიც Duchenne muscular dystrophy-ს და თავის ტვინში ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული ცვლილებისას [60; 95]. როგორც ცნობილია, Ca^{2+}ის ჭარბი რაოდენობა ციტოტოქსიკურია უჯრედებისათვის, რაც აისახება სიცოცხლისუნარიანი

უჯრედების რაოდენობაზე [43]. როგორც სურათი 12-დან ჩანს, G2 ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპში შეინიშნება სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების შემცირება, თუმცა კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანისას შემთხვევაში ექსპერიმენტის 30-ე დღეს სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობა სარწმუნოდაა მომატებული (G3 ჯგუფი).

ოქსიდაციური სტრესს თან სდევს ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითება, აქტიური რადიკალების სიჭარბე, ჰორმონალური სტატუსის ცვლილება, ასევე მიტოქონდრიული დისფუნქციები და ანაბოლური პროცესების, მათ შორის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების სინთეზის და აქტივობის შემცირებაც [69; 16]. ჩვენს ექსპერიმენტში ნანახი იქნა, რომ ამ მოდელის ქრონიკულ სტრესს ჰიპოკამპის უჯრედებში თან ახლავს Cu,Zn-SOD-ის და კატალაზას აქტივობის სარწმუნო დაქვეითება. მათგან განსხვავებით ვერ იქნა ნანახი სარწმუნო ცვლილებები გლუტათიონრედუქტაზას შემთხვევაში (სურ.15 A,B). თუმცა სტრესის პირობებში კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა ორგანიზმში მნიშვნელოვნად ზრდის ამ ფერმენტების აქტივობას ჰიპოკამპის უჯრედებში (G3 ჯგუფი).

იმის დასადგენად, თუ რა განაპირობებს ფერმენტული რეაქციების ცვლილებას კრეატინის ინტრაპერიტონიალურად მიწოდებისას, შესწავლილი იქნა ამ ფერმენტების კინეტიკური მახასიათებლები (V_{max},Km). როგორც ცნობილია, ზოგადად ბიოქიმიური რეაქციების აქტივობის დაქვეითების ერთერთი მიზეზია როგორც ფერმენტების სტრუქტურული, ასევე მათი რაოდენობრივი ცვლილებები [16]. სურათზე 4A და 4B წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ სტრესის პირობებში მცირდება როგორც რეაქციების V_{max}, ასევე ამ ფერმენტების თვისობა სუბსტრატებისადმი. ამდენად სავარაუდოა, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მიმდინარე სოციალური იზოლაციისას ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობის შემცირების მიზეზი იყოს როგორც ოქსიდაციური სტრესის შედეგად ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და შესაბამისად, ანაბოლური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითება, ასევე აქტიური რადიკალებით გამოწვეული ფერმენტების სტრუქტურული ცვლილებებიც [111].

როგორც სურათი 4A და 4B-დან ჩანს, კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა (G3 ჯგუფი) ზრდის ამ ფერმენტების V_{max}-ს. ზოგიერთი ავტორი კრეატინის

ამ ეფექტს უკავშირებს მის მონაწილეობას Cr/CK/PCr სისტემის ფუნქციონირებაში, რაც ზრდის უჯრედის ენერგეტიკულ პოტენციალს და ანაბოლური პროცესების ინტენსივობა და ხელს უწყობს სხვადასხვა ცილების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობის მატებას [105; 10; 47]. თუმცა არსებობს განსხვავებული მოსაზრებაც, რომ კრეატინის ეს ეფექტი განპირობებულია მხოლოდ მისი თვისებით, მოახდინოს ენდოგენური რეაქტიური რადიკალების შებოჭვა და მათი განეიტრალება ისე, რომ არ იმოქმედოს ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობაზე [51]. კრეატინის ეს უკანასკნელი ეფექტი გამოჩნდა ჩვენს ექსპერიმენტშიც, რომელიც აჩვენებს, რომ კრეატინის შეყვანის პირობებში იზრდება არა მარტო რეაქციების V_{max}, არამედ სოდ-ისა და კატალაზას თვისობა (1/Km) სუბსტრატებისადმი (სურ.16 A, B). ამდენად, მიღებული მონაცემები გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ კრეატინის ანტიოქსიდანტური ეფექტი განპირობებულია ორი ძირითადი მიზეზით. პირველი გულისხმობს კრეატინის დამატებით უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის გაძლიერებასა და შესაბამისად, ფერმენტების რაოდენობის გაზრდას, ხოლო მეორე მიზეზს წარმოადგენს მის უშუალო მონაწილეობა აქტიური რადიკალების განეიტრალების პროცესში.

ცნობილია რა უჯრედში Ca^{2+}-ის ტრანსპორტირების მექანიზმი, მისი რაოდენობრივი ცვლილების მიზეზი შესაძლებელია იყოს კრეატინის პირდაპირი ზემოქმედება Ca^{2+}-ატფ-აზებზე ან პოტენციალ-მგრძნობიარე არხებზე, კერძოდ იონოტროპულ NMDA-რეცეპტორზე [111;]. სურათი 17 A,B,C -ზე წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებს, რომ ბუნებრივი დღე-ღამური ციკლის დარღვევის შემთხვევაში შემცირებულია მხოლოდ პლაზმური მემბრანის Ca^{2+}-ATP-აზა-ს აქტივობა, იმ დროს, როცა მიტოქონდრიული და მიკროსომული იზოფორმების აქტივობა უცვლელია, რაც ასევე ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს [97; 111; 113]. თუმცა კრეატინის შეყვანა არ ცვლის არც ერთი იზოფორმის აქტივობას (G3 ჯგუფი), რაც გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოდ, რომ Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი შემცველობის ცვლილება არაა დამოკიდებული ამ ფერმენტების მოქმედებაზე და ამდენად, განპირობებული უნდა იყოს Ca^{2+}-ის არხების ფუნქციონირებაზე. ცნობილია, რომ თავის ტვინში ქრონიკული სტრესით განპირობებული ოქსიდაციური პროცესების მიმართ განსაკუთრებულ მგრძნობელობას ავლენს NMDA-რეცეპტორი, კერძოდ მისი N1 სუბერთეული[16; 73].

ოქსიდაციური პროცესები ზრდის რა ჰემატოენცეფალური ბარიერის გავლადობას, იწვევს ასევე NMDA-რეცეპტორის აქტივაციას N1 სუბერთეულის ფოსფორილირებით და შესაბამისად, უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის რაოდენობის მატებას [16; 70; 82]. სტრესის პირობებში NMDA-რეცეპტორის აქტივაციის მიზეზი ზოგიერთი ჰორმონის, მათ შორის სეროტონინისა და კორტიკოსტერონის რაოდენობრივი ცვლილებებია [117; 7]. ჩვენმა კვლევებმა ხანგრძლივი ბუნებრივი ცირკადული ციკლის დარღვევით გამოწვეული სტრესის დროს აჩვენა ამ ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებებიც [22; 72]. ამდენად, სავარაუდოა, რომ დღე-ღამური ციკლის დარღვევისა და სოციალური იზოლაციის დროს ჰიპოკამპის უჯრედებში Ca^{2+}-ის რაოდენობის მატების მიზეზი შესაძლებელია იყოს ჰორმონების ზემოქმედებით ინდუცირებული NMDA-რეცეპტორის აქტივაცია და უჯრედგარე Ca^{2+}-ის უჯრედში შედინების ზრდა, რასაც მოსდევს NO-ს სინთეზას და ოქსიდაციური პროცესების გააქტიურება და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის დაქვეითება.

ამ მოსაზრებას ადასტურებს ექსპერიმენტი, სადაც ნაჩვენებია საკვლევ ჯგუფებში Na^{+},K^{+}-ATP-აზა-ს აქტივობის ცვლილება. როგორც ცნობილია, NMDA-რეცეპტორსა და Na,K-ATP-აზა-ს შორის არსებობს როგორც ფუნქციური, ასევე სტრუქტურული ურთიერთკავშირი [3; 23]. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ G2 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში Na,K-ATP-აზა-ს ინჰიბიტორის Ca^{2+}-ის რაოდენობის ზრდის პარალელურად, შეინიშნება ამ ფერმენტის აქტივობის სარწმუნო შემცირება, რაც შესაბამისობაშა ლიტერატურულ მონაცემებთან [116] და კრეატინის ხანგრძლივი პერიოდით შეყვანა ზრდის სტრესის პირობებში მის აქტივობას (G3 ჯგუფი) (სურ.18 A). ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, სავარაუდოდ კრეატინის მასტიმულირებელი ეფექტის მიზეზი უნდა იყოს კრეატინის უშუალო ზემოქმედებით NMDA-რეცეპტორის აქტივობის მოდულირება, პოტენციალ-მგრძნობიარე Na-არხების ჩაკეტვა და კალცინეირინული სასიგნალო გზის აქტივაცია, რასაც მოსდევს Na,K-ATPაზას გააქტიურება [14].

კრეატინის მოდულატორული თვისება, მოახდინოს უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი კორექცია NMDA-რეცეპტორზე უშუალო ზემოქმედებით, ჩანს ასევე ექსპერიმენტში, სადაც შესწავლილია მისი გავლენა Mg^{2+}-ATPაზა-ზე (სურ.20 B).

ცნობილია, რომ Na,K-ATP-აზასგან განსხვავებით, Mg-ATP-აზა-ს აქტივობა არ არის დამოკიდებული NMDA-რეცეპტორზე და შესაბამისად, უჯრედშიდა Ca^{2+}-ზე [67]. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა არ ცვლის ამ ფერმენტის აქტივობას (სურ.20 B).

ამ მოსაზრებას კიდევ უფრო ადასტურებს ასევე ექსპერიმენტი, სადაც შევისწავლეთ NMDA რეცეპტორის და Na,K-ATPაზა-ს სუბერთეულების რაოდენობრივი ცვლილებები. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებიდან იკვეთება, რომ NR-2A სუბერთეულის და მისი ფოსფორილირებული იზოფორმის ექსპრესიის ხარისხი სარწმუნოდ არ იცვლება, განსხვავებით NR2B-სუბერთეულის, ასევე მისი ფოსფორილირებული ფორმების, კერძოდ p-NR2B (Ser1284), p-NR2B (Ser1070) შემთხვევაში. მათი ექსპრესიის ხარისხი ცირკადული რიტმით განპირობებული სტრესის პირობებში ძლიერდება, ხოლო კრეატინის ეგზოგენური მიწოდების პირობებში მცირდება. ლიტერატურული მონაცემებით დადგენილია, რომ NMDA-რეცეპტორს გააჩნია კრეატინთან ურთიერთქმედების რამდენიმე საიტი, რაც ამ უკანასკნელს აძლევს საშუალებას მოახდინოს NMDA-რეცეპტორის მოქმედების რეგულირება [136]. ამასთან, Na,K-ATPაზა-ს სუბერთეულების ექსპრესიის ხარისხის შესწავლამაც აჩვენა, რომ α1 და α3 -სუბერთეულების რაოდენობა მეორე ჯგუფის ცხოველებში სარწმუნოდ მცირდება, ხოლო α2 სუბერთეულის ცვლილებები ვერ იქნა ნანახი, ხოლო კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა α1 და α3 -სუბერთეულების რაოდენობას ზრდის. დადგენილია, რომ Na^{+},K^{+}-ATPაზა-ის ინჰიბირება NMDA-რეცეპტორის აქტივაციით დამოკიდებულია უჯრედშიდა Ca^{2+}-ზე, შესაბამისად, ცირკადული რიტმით განპირობებული სტრესის პირობებში ეგზოგენურად მიწოდებული კრეატინი გვევლინება, როგორც მოდულატორი, რომელსაც შესწევს უნარი NMDA-რეცეპტორთან ურთიერთქმედებით თავიდან აიცილოს ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო–ემოციური სტრესის შედეგად გაზრდილი უჯრედშიდა კალციუმის იონის ციტოტოქსიკური ეფექტი.

ცნობილია, რომ ცირკადული რიტმი თავის მხრივ განისაზღვრება ე. წ. საათის გენებით, რომელთა ცილოვანი პროდუქტები ჩართულნი არიან უჯრედულ პროცესებში, მათ შორის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში. აღსანიშნავია, რომ საათის გენების პროდუქტებს გააჩნიათ სპეციფიკური სტრუქტურა, კერძოდ მათ

მოლეკულაში შეინიშნება ე.წ. PAS-დომენი და გავლენას ახდენენ ნიკოტინამიდფოსფოტრანსფერაზას გენის აქტივობაზე. თავად ამ ფერმენტის მოქმედება აძლიერებს ჟანგვა-აღდგენით რეაქციებს NAD^+-ის წარმოქმნის გააქტივებით და ხელს უწყობს უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკული პროცესების ზრდას. NAD^+ -ის რაოდენობის ზრდა ააქტიურებს სირტუინ-1-ს, რომელიც აწარმოებს ისეთი სპეციფიკური ცილების დეაციტილირებას, როგორიცაა Bmal1-, Per2- და Clock-ცილები. ამ თავალსაზრისით ჩვენ შევისწავლეთ Bmal1, Per1, Clock გენების პროდუქტები. კერძოდ, სტრესის პირობებში შეინიშნება BMAL-1-ის რაოდენობის მატება, რაც განპირობებულია SIRT-ზე მელატონინის პერმანენტული მაინჰიბირებელი გავლენით. ჩვენი წინა კვლევებით დადგენილია, რომ მელატონინის რაოდენობა დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში იმატებს, ამასთან მას მნიშვნელოვანი ფუნქცია აკისრია ცირკადული საათის მოლეკულურ მექანიზმში. კერძოდ, CLOCK-ცილას, რომელიც CLOCK-გენის პროდუქტს წარმოადგენს და ითვლება, როგორც ტრანსკრიპციის აქტივატორი, გააჩნია ფერმენტული აქტივობა, კერძოდ წარმოადგენს ჰისტონური ცილების აცეტილტრანსფერაზას. ამის საპირისპიროდ, NAD+ -დამოკიდებული SIRT1 კი მოქმედებს, როგორც დეაცეტილაზა, ანუ მისი მოქმედებით მცირდება ტრანსკრიფციული პროცესის ინტენსივობა. ინტრაპერიტონიალურად კრეატინის ეგზოგენური დამატება არ ცვლის ჰიპოკამპის უჯრედებში საათის გენების მიერ სინთეზირებული ტრანსკრიფციული ფაქტორების რაოდენობას. განსხვავებული შედეგებია მიღებული CLOCK-ის შემთხვევაში, კერძოდ, აღინიშნება მისი რაოდენობის სარწმუნო შემცირება სტრესის დროს, ხოლო კრეატინის ეგზოგენური მიწოდება არ ცვლის CLOCK-ის რაოდენობრივ შემცველობას. თუ გავითვალისწინებთ, რომ CLOCK ახდენს BMAL-1-ის აცეტილირებას, რაც აუცილებელია PER:CRY ჰეტეროდიმერის წარმოქმნისათვის და შემდგომი ეფექტებისათვის, სტრესის პირობებში CLOCK-ის რაოდენეობის შემცირება უარყოფითად მოქმედებს უჯრედში გენების ექსპრესიასა და ამ პირობებში მიმდინარე სინთეზურ პროცესებზე. გასათვალისწინებელია ასევე ის ფაქტიც, რომ BMAL-1/ CLOCK -ის დიმერი აუცილებელია PER/CRY -ის შემდგომი აქტივობისათვის. BMAL-1/ CLOC-K-ის რაოდენობის შემცირება უარყოფითად მოქმედებს PER/CRY -ის აქტივობაზე იმის გათვალისწინებით, რომ ეს უკანასკნელი

ხდება SIRT1-ის სამიზნე, რაც იწვევს PER1-ზე პროტეოლიზური ფერმენტების მოქმედებას და შესაბამისად, მისი რაოდენობის კლებას [41]. ამავე დროს, ჩვენს ექსპერიმენტში გამოიკვეთა, რომ კრეატინის ეგზოგენური მიწოდება არ ცვლის საათის გენების მიერ სინთეზირებული ტრანსკრიფციული ფაქტორების მოქმედების ხარისხს. შესაბამისად, კრეატინის ეფექტი ზოგიერთი მიტოქონდრიული ფერმენტის აქტივობაზე გამოწვეული უნდა იყოს კრეატინის მონაწილეობით ენერგეტიკულ პროცესებში, რაც აისახება ფერმენტების სინთეზის გაძლიერებით.

ამრიგად, მიღებული შედეგები აჩვენებენ, რომ ეგზოგენური გზით ორგანიზმში მოხვედრილი კრეატინი ენერგეტიკულ პროცესებში აქტიური მონაწილეობის გარდა, ასრულებს ასევე პროტექტორულ ფუნქციასაც. კერძოდ, აძლიერებს რა სტრესის შედეგად დაქვეითებულ ენერგეტიკულ პოტენციალს თავის ტვინის უჯრედებში, ზრდის ცილოვანი მოლეკულების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების რაოდენობას მათი სინთეზის გაძლიერების ხარჯზე. ამავე დროს, ურთიერთქმედებს რა NMDA-რეცეპტორზე და შესაბამისად, უჯრედში Ca^{2+}-ის ჰომეოსტაზე, ახდენს ამ რეცეპტორის ფუნქციონირების მოდულირებას, რაც ამცირებს სტრესის შედეგად ჰიპოკამპის უჯრედში გაზრდილი Ca^{2+}-ის შემცველობას და მისი სიჭარბით გამოწვეულ ციტოტოქსიკურ ეფექტს.

მიღებული შედეგები

1. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევა იწვევს ფსიქო-ემოციური სტრესის ჩამოყალიბებას, რაც მიმდინარეობს ექსპერიმენტული ცხოველების შფოთიანობისა, ემოციური დაძაბულობის მატებისა და კვლევითი რეაქციებისა და ლოკომოციური აქტივობის მნიშვნელოვანი შემცირებით;

2. ფიზიოლოგიური მაჩვენებლების ცვლილების გარდა შეინიშნება ასევე ზოგიერთი ჰორმონის შემცველობის ცვლილებაც;

3. ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევისას ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედებში შეინიშნება ოქსიდაციური პროცესების გააქტივება, რაც ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბებას განპირობებს. თუმცა სტრესის ფონზე კრეატინის ეგზოგენური შეყვანა ამცირებს ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობას, რაც ვლინდება ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების რაოდეობისა და შესაბამისად, მათი აქტივობის ზრდაში;

4. ამ პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში აღინიშნება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი დაქვეითება, რისი მაჩვენებელიცაა ამ პროცესში ჩართული ფერმენტების აქტივობის სარწმუნო დაქვეითება. ამავე დროს ექსპერიმენტული ცხოველების იმ ჯგუფში, რომლებსაც სტრესის ფონზე ყოველდღიურად შეყვანილი ჰქონდათ ეგზოგენური კრეატინი აღენიშნებათ ფერმეტული რეაქციების აქტივობის მატება;

5. ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართული ფერმენტების აქტივობის კინეტიკური პარამეტრების შესწავლამ აჩვენა ამ ფერმენტების რაოდენობრივი შემცირება, ხოლო კრეატინის ეგზოგენურად მიწოდების პირობებში ფერმენტების აქტივობის მატების მიზეზი ხდება ანაბოლური პროცესების გააქტივება, რაც ხელს უწყობს ამ ფერმენტების რაოდენობისა და შესაბამისად, მათი აქტივობის ზრდას;

6. ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში PI3K /AKT/PKB /mTOR სასიგნალო გზის შესწავლამ აჩვენა ამ გზის ინტენსივობის დაქვეითება, რაც აისახება ზოგადად ცილის სინთეზის პროცესის

შეფერხებასა და მათ შორის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების რაოდენობრივ შემცირებაში.

7. ექსპერიმენტულად დადგინდა, რომ სტრესის პირობებში კრეატინის ეგზოგენური შეყვანა ზრდის ამ სასიგნალო გზის მიმდინარეობის ინტენსივობას, რაც აისახება ამ გზის კომპონენტების ექსპრესიის მატებაში.

8. გამოთთქმულია ვარაუდი, რომ ზემოთაღნიშნული პროცესების მიზეზი შესაძლებელი იყოს ოქსიდაციური სტრესის შედეგად ჰიპოკამპის უჯრედებში გლუტამატის NMDA-რეცეპტორის ჰიპერაქტივაცია და Ca^{2+}-ის სიჭარბე, რაც ექსპერიმენტულად იქნა ნანახი;

9. ექსპერიმენტულად დადასტურებულია კრეატინის ნეირომოდულატორული ეფექტი NMDA-რეცეპტორის სუბერთეულების ექსპესიის ხარისხზე;

10. ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში შეიიშნება ე.წ. „საათის გენების“ მიერ სინთეზირებული ტრანსკრიფციული ფაქტორების რაოდენობის არაერთგვაროვანი ცვლილებები, თუმცა კრეატინის ეგზოგენური მიწოდება არ ცვლის საათის გენების მიერ სინთეზირებული ტრანსკრიფციული ფაქტორების მოქმედების ხარისხს.

11. ზემოთმოყვანილი მონაცემების გათვალისწინებით სავარაუდოა, რომ კრეატინის დადებით ეფექტი ხანგრლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში განვითარებულ ჟანგვითი სტრესსა და დაქვეითებულ ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე, გამოწვეულია კრეატინის ნეირომოდულატორული თვისებებით.

დასკვნა

1. შესწავლილია ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური სისტემასა და ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე. დადგინდა, რომ კრეატინი ზრდის ამ პროცესებში მონაწილე ფერმენტების აქტივობას;

2. მიღებული მონაცემების ანალიზზე დაყრდნობით, იკვეთება კრეატინის ნეიროპროტექტორული შესაძლებლობები ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Aguilar-Paredes, O. A., Castillo-Guevara, C., Díaz-Godínez, R., Nieto-Camacho, A., & Méndez-Iturbide, D. (2018, March 1). Antioxidants and inhibition of free radicals: lipoperoxidation and carbonylation. *Mexican Journal of Biotechnology*. Universidad Autonoma de Tlaxcala. https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.60

2. Akinaga, J., García-Sáinz, J. A., & S. Pupo, A. (2019, July 1). Updates in the function and regulation of α1-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/bph.14617

3. Akkuratov, E. E., Lopacheva, O. M., Kruusmägi, M., Lopachev, A. V., Shah, Z. A., Boldyrev, A. A., & Liu, L. (2015). Functional Interaction Between Na/K-ATPase and NMDA Receptor in Cerebellar Neurons. *Molecular Neurobiology*, *52*(3), 1726–1734. https://doi.org/10.1007/s12035-014-8975-3

4. Allen, P. J. (2012, May). Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.03.005

5. Altun, A., & Ugur-Altun, B. (2007, May). Melatonin: Therapeutic and clinical utilization. *International Journal of Clinical Practice*. https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.01191.x

6. Amaral, F. G. D., & Cipolla-Neto, J. (2018, September 1). A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066

7. Andres, A. L., Regev, L., Phi, L., Seese, R. R., Chen, Y., Gall, C. M., & Baram, T. Z. (2013). NMDA receptor activation and calpain contribute to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH. *Journal of Neuroscience*, *33*(43), 16945–16960. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1445-13.2013

8. Araújo, M. B., Moura, L. P., Junior, R. C. V., Junior, M. C., Dalia, R. A., Sponton, A. C., … Mello, M. A. R. (2013). Creatine supplementation and oxidative stress in rat liver. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 10(1), 54. https://doi.org/10.1186/1550-2783-10-54

9. Arendtw, J. (2006, March 4). Does melatonin improve sleep?: Efficacy of melatonin. *BMJ*. https://doi.org/10.1136/bmj.332.7540.550

10. Bassit, R. A., Pinheiro, C. H. D. J., Vitzel, K. F., Sproesser, A. J., Silveira, L. R., & Curi, R. (2010). Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *European Journal of Applied Physiology*, *108*(5), 945–955. https://doi.org/10.1007/s00421-009-1305-1

11. Beda, N., & Nedospasov, A. (2005). A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, *13*(2), 93–97. https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.05.002

12. Bell, C. (2009). Clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd edition. Norbert W. Tietz, ed. *Transfusion*, *35*(11), 972–972. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.1995.tb03571.x

13. Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*. https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802

14. Bertuccio, C. A., Cheng, S. X., Arrizurieta, E. E., Martín, R. S., & Ibarra, F. R. (2003). Mechanisms of Na+-K+-ATPase phosphorylation by PKC in the medullary thick ascending limb of Henle in the rat. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *447*(1), 87–96. https://doi.org/10.1007/s00424-003-1144-6

15. Betzen, C., White, R., Zehendner, C. M., Pietrowski, E., Bender, B., Luhmann, H. J., & Kuhlmann, C. R. W. (2009). Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(8), 1212–1220. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.034

16. Bhabak, K. P., & Mugesh, G. (2010). Functional mimics of glutathione peroxidase: Bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of Chemical Research*, *43*(11), 1408–1419. https://doi.org/10.1021/ar100059g

17. Bobrovskikh, A., Zubairova, U., Kolodkin, A., & Doroshkov, A. (2020). Subcellular compartmentalization of the plant antioxidant system: An integrated overview. *PeerJ*. PeerJ Inc. https://doi.org/10.7717/PEERJ.9451

18. Branch, J. D. (2003). Effect of creatine supplementation on body composition and performance: A meta-analysis. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, *13*(2), 198–226. https://doi.org/10.1123/ijsnem.13.2.198

19. Brosnan, J. T., da Silva, R. P., & Brosnan, M. E. (2011, May). The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids*. https://doi.org/10.1007/s00726-011-0853-y~

20. Brière, J. J., Favier, J., El Ghouzzi, V., Djouadi, F., Bénit, P., Gimenez, A. P., & Rustin, P. (2005, October). Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cellular and Molecular Life Sciences*. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5237-6

21. Brito, M. B., Goulielmaki, E., & Papakonstanti, E. A. (2015). Focus on PTEN regulation. *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00166

22. Burjanadze, G. M., Kuchukashvili, Z. T., Chachua, M. V., Menabde, K. O., Dachanidze, N. T., & Koshoridze, N. I. (2014). Changes in activity of hippocampus creatine kinase under circadian rhythm disorders. *Biological Rhythm Research*, *45*(5), 685–697. https://doi.org/10.1080/09291016.2014.888172

23. Carvalho, F. B., Mello, C. F., Marisco, P. C., Tonello, R., Girardi, B. A., Ferreira, J., … Rubin, M. A. (2012). Spermidine decreases Na +,K +-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *European Journal of Pharmacology*, *684*(1–3), 79–86. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.046

24. Calabrese, F., Guidotti, G., Molteni, R., Racagni, G., Mancini, M., & Riva, M. A. (2012). Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: Modulation by duloxetine treatment. *PLoS ONE*, *7*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037916

25. Chiou, Y. Y., Li, T. Y., Yang, Y., & Sancar, A. (2020). A Sextuple Knockout Cell Line System to Study the Differential Roles of CRY, PER, and NR1D in the Transcription-Translation Feedback Loop of the Circadian Clock. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.616802

26. Clausen, M. V., Hilbers, F., & Poulsen, H. (2017, June 6). The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00371

27. Clarke, H., Kim, D. H., Meza, C. A., Ormsbee, M. J., & Hickner, R. C. (2020, September 1). The evolving applications of creatine supplementation: Could creatine improve vascular health? *Nutrients*. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu12092834

28. Chiu, A. M., Wang, J., Fiske, M. P., Hubalkova, P., Barse, L., Gray, J. A., & Sanz-Clemente, A. (2019). NMDAR-Activated PP1 Dephosphorylates GluN2B to Modulate NMDAR Synaptic Content. *Cell Reports*, *28*(2), 332-341.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.030

29. Cooper, M. A., Clinard, C. T., & Morrison, K. E. (2015, April 6). Neurobiological mechanisms supporting experience-dependent resistance to social stress. *Neuroscience*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.072

30. de Abreu, M. S., Demin, K. A., Giacomini, A. C. V. V., Amstislavskaya, T. G., Strekalova, T., Maslov, G. O., … Kalueff, A. V. (2021). Understanding how stress responses and stress-related behaviors have evolved in zebrafish and mammals. *Neurobiology of Stress*, *15*. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100405

31. Dalton, E. J., Rotondi, D., Levitan, R. D., Kennedy, S. H., & Brown, G. M. (2000). Use of slow-release melatonin in treatment-resistant depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *25*(1), 48–52.

32. Datson, N. A., Morsink, M. C., Meijer, O. C., & de Kloet, E. R. (2008, April 7). Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *European Journal of Pharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.070

33. Datson, N. A., Van Den Oever, J. M. E., Korobko, O. B., Magarinos, A. M., De Kloet, E. R., & McEwen, B. S. (2013). Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. *Endocrinology*, *154*(9), 3261–3272. https://doi.org/10.1210/en.2012-2233

34. Dalla Pozza, E., Dando, I., Pacchiana, R., Liboi, E., Scupoli, M. T., Donadelli, M., & Palmieri, M. (2020, February 1). Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.013

35. Dhalla, N. S., Ganguly, P. K., Bhullar, S. K., & Tappia, P. S. (2019). Role of catecholamines in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Canadian Science Publishing. https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0044

36. Deminice, R., Rosa, F. T., Franco, G. S., Jordao, A. A., & de Freitas, E. C. (2013). Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. *Nutrition*, *29*(9), 1127–1132. https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.03.003

37. Dolberg, O. T., Hirschmann, S., & Grunhaus, L. (1998). Melatonin for the treatment of sleep disturbances in major depressive disorder. *American Journal of Psychiatry*, *155*(8), 1119–1121. https://doi.org/10.1176/ajp.155.8.1119

38. Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H., & Samarakoon, S. R. (2019, December 1). Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.012

39. Estévez, M., Skarda, J., Spencer, J., Banaszak, L., & Weaver, T. M. (2002). X-ray crystallographic and kinetic correlation of a clinically observed human fumarase mutation. *Protein Science*, *11*(6), 1552–1557. https://doi.org/10.1110/ps.0201502

40. E. Camacho, M., D. Carrion, M., C. Lopez-Cara, L., Entrena, A., A. Gallo, M., Espinosa, A., … Acuna-Castroviejo, D. (2012). Melatonin Synthetic Analogs as Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *12*(7), 600–617. https://doi.org/10.2174/138955712800626674

41. Fahrenkrug, J., Hannibal, J., & Georg, B. (2008). Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes Per1, Per2 and Bmal1 in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(3), 323–329. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01651.x

42. Floyd, S., Favre, C., Lasorsa, F. M., Leahy, M., Trigiante, G., Stroebel, P., … O'Connor, R. (2007). The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(9), 3545–3555. https://doi.org/10.1091/mbc.E06-12-1109

43. Gao, Z. Y., Collins, H. W., Matschinsky, F. M., Lee, V. M. Y., & Wolf, B. A. (1998). Cytotoxic effect of β-amyloid on a human differentiated neuron is not mediated by cytoplasmic Ca2+ accumulation. *Journal of Neurochemistry*, *70*(4), 1394–1400. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70041394.x

44. Gastro, L., Tórtora, V., Mansilla, S., & Radi, R. (2019). Aconitases: Non-redox Iron-Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species. *Accounts of Chemical Research*, *52*(9), 2609–2619. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00150

45. Gilley, R., Balmanno, K., Cope, C. L., & Cook, S. J. (2013). Adaptation to chronic mTOR inhibition in cancer and in aging. *Biochemical Society Transactions*, *41*(4), 956–961. https://doi.org/10.1042/BST20130080

46. Giuseppe Potrick, Stefani Ramiro, Barcos Nunes, Claudia Ramos Rhoden; CREATINE SUPPLEMENTATION: A Novel Role in Antioxidant System in Exercise and In Chronic Diseases CONTEXTO & SAÚDE IJUÍ EDITORA UNIJUÍ v. 14 n. 27 JUL./DEZ. 2014 p. 32-43

47. Goleman, D., Boyatzis, R., & McKee, A. (2002). Primal Leadership (Book). *T+D*, *56*(3), 81. Retrieved from http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=buh&AN=6335983&site=ehost-live

48. Godoy, L. D., Rossignoli, M. T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., & Umeoka, E. H. de L. (2018, July 3). A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127

49. Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R. B., & Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes and Development*, *15*(11), 1406–1418. https://doi.org/10.1101/gad.889901

50. Gulcin, İ. (2020, March 1). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. Springer. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3

51. Guimarães-Ferreira, L., Pinheiro, C. H. J., Gerlinger-Romero, F., Vitzel, K. F., Nachbar, R. T., Curi, R., & Nunes, M. T. (2012). Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *112*(11), 3905–3911. https://doi.org/10.1007/s00421-012-2378-9

52. Chalhoub, N., & Baker, S. J. (2009, February). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311

53. Hashimoto, T., Hussien, R., Cho, H. S., Kaufer, D., & Brooks, G. A. (2008). Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: Demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PLoS ONE*, *3*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002915

54. Heneberg, P. (2019, January 20). Redox regulation of hexokinases. *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7255

55. Herr, N., Bode, C., & Duerschmied, D. (2017, July 20). The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00048

56. Huang, C. C., Lai, C. J., Tsai, M. H., Wu, Y. C., Chen, K. T., Jou, M. J., … Wei, I. H. (2015). Effects of melatonin on the nitric oxide system and protein nitration in the hypobaric hypoxic rat hippocampus. *BMC Neuroscience*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12868-015-0199-6

57. Izídio, G. S., Lopes, D. M., Spricigo, L., & Ramos, A. (2005). Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. *Genes, Brain and Behavior*, *4*(7), 412–419. https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00121.x

58. Iuliano, M., Seeley, C., Sapp, E., Jones, E. L., Martin, C., Li, X., … Kegel-Gleason, K. B. (2021). Disposition of Proteins and Lipids in Synaptic Membrane Compartments Is Altered in Q175/Q7 Huntington's Disease Mouse Striatum. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.618391

59. Jhanwar-Uniyal, M., Wainwright, J. V., Mohan, A. L., Tobias, M. E., Murali, R., Gandhi, C. D., & Schmidt, M. H. (2019, May 1). Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Advances in Biological Regulation*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.03.003

60. Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., & Vina, J. (2006). Exercise and hormesis: Activation of cellular antioxidant signaling pathway. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1067, pp. 425–435). Blackwell Publishing Inc. https://doi.org/10.1196/annals.1354.061

61. Ji, L. L, Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E.,., & Viña, J. (2006). Exercise as an antioxidant: it up-regulates important enzymes for cell adaptations to exercise. *Science and Sports*, *21*(2), 85–89. https://doi.org/10.1016/j.scispo.2005.06.012

62. Jung, Y. H., Jang, J. H., Lee, D., Choi, Y., Choi, S. H., & Kang, D. H. (2019). Relationships Between Catecholamine Levels and Stress or Intelligence. *Neurochemical Research*. https://doi.org/10.1007/s11064-019-02762-z

63. Joëls, M., Krugers, H. J., Lucassen, P. J., & Karst, H. (2009, October 1). Corticosteroid effects on cellular physiology of limbic cells. *Brain Research*. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.036

64. John M. Lawler,1 William S. Barnes, Gaoyao Wu, Wook Song, and Scott Demaree;Direct Antioxidant Properties of Creatine-Biochemical and Biophysical Research Communications 290, 47-52, February 2002

65. Kaptain, S., Downey, W. E., Tang, C., Philpott, C., Haile, D., Orloff, D. G., … Klausner, R. D. (1991). A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(22), 10109–10113. https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10109

66. Kingsley, M. I. C., Cunningham, D., Mason, L., Kilduff, L. P., & McEneny, J. (2009). Role of creatine supplementation on exercise-induced cardiovascular function and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(4), 247–254. https://doi.org/10.4161/oxim.2.4.9415

67. Kinoshita, P. F., Leite, J. A., Orellana, A. M. M., Vasconcelos, A. R., Quintas, L. E. M., Kawamoto, E. M., & Scavone, C. (2016, June 2). The influence of Na+, K+-ATPase on glutamate signaling in neurodegenerative diseases and senescence. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00195

68. Kehoe, L. A., Bernardinelli, Y., & Muller, D. (2013). GluN3A: An NMDA receptor subunit with exquisite properties and functions. *Neural Plasticity*. Hindawi Publishing Corporation. https://doi.org/10.1155/2013/145387

69. Krishnan, N., Davis, A. J., & Giebultowicz, J. M. (2008). Circadian regulation of response to oxidative stress in Drosophila melanogaster. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *374*(2), 299–303. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.011

70. Kreider, R. B., & Stout, J. R. (2021). Creatine in health and disease. *Nutrients*, *13*(2), 1–28. https://doi.org/10.3390/nu13020447

71. Koeck, T., Levison, B., Hazen, S. L., Crabb, J. W., Stuehr, D. J., & Aulak, K. S. (2004). Tyrosine nitration impairs mammalian aldolase A activity. *Molecular and Cellular Proteomics*, *3*(6), 548–557. https://doi.org/10.1074/mcp.M300141-MCP200

72. Koshoridze, N., Kuchukashvili, Z., Menabde, K., Lekiashvili, S., & Koshoridze, M. (2016). ALTERATIONS IN BRAIN CREATINE CONCENTRATIONS UNDER LONG-TERM SOCIAL ISOLATION (EXPERIMENTAL STUDY). *Georgian Medical News*, (251), 70–77.

73. Kuchukashvili, Z., Burjanadze, G., Menabde, K., Chachua, M., Dachanidze, N., Mikadze, M., & Koshoridze, N. (2012). Long-lasting stress, quantitative changes in nitric oxide concentration and functional state of brain mitochondria. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *72*(1), 40–50.

74. Kumar, V., Frost, R. A., & Lang, C. H. (2002). Alcohol impairs insulin and IGF-I stimulation of S6K1 but not 4E-BP1 in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *283* (5 46-5). https://doi.org/10.1152/ajpendo.00181.2002

75. Lawler, J. M., Barnes, W. S., Wu, G., Song, W., & Demaree, S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(1), 47–52. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6164

76. Lang, C. H., Frost, R. A., Deshpande, N., Kumar, V., Vary, T. C., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2003). Alcohol impairs leucine-mediated phosphorylation of 4E-BP1, S6K1, eIF4G, and mTOR in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *285*(6 48-6). https://doi.org/10.1152/ajpendo.00177.2003

77. L. T, Y, L., K, C., TS, V., & J, M. (2019). Dietary Antioxidants, Macular Pigment, and Glaucomatous Neurodegeneration: A Review of the Evidence. *Nutrients*, *11*(5), 1002. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31052471/

78. Leshets, M., Silas, Y. B. H., Lehming, N., & Pines, O. (2018, July 25). Fumarase: From the TCA Cycle to DNA Damage Response and Tumor Suppression. *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00068

79. Maestroni, G. J. M. (2020, March 1). Adrenergic Modulation of Hematopoiesis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. Springer. https://doi.org/10.1007/s11481-019-09840-7

80. Maigaard, K., Hageman, I., Jørgensen, A., Jørgensen, M. B., & Wörtwein, G. (2012). Electroconvulsive stimulations prevent chronic stress-induced increases in L-type calcium channel mRNAs in the hippocampus and basolateral amygdala. *Neuroscience Letters*, *516*(1), 24–28. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.043

81. McLain, A. L., Szweda, P. A., & Szweda, L. I. (2011, January). α-Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor. *Free Radical Research*. https://doi.org/10.3109/10715762.2010.534163

82. Meyer-Bernstein, E. L., & Morin, L. P. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *Journal of Neuroscience*, *16*(6), 2097–2111. https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-06-02097.1996

83. Melov, S., Schneider, J. A., Day, B. J., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra, S. S., … Wallace, D. C. (1998). A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, *18*(2), 159–163. https://doi.org/10.1038/ng0298-159

84. Musiek, E. S. (2015). Circadian clock disruption in neurodegenerative diseases: Cause and effect? *Frontiers in Pharmacology*, *6*(FEB). https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00029

85. Murugan, A. K. (2019, December 1). mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.003

86. Na, E. J., Nam, H. Y., Park, J., Chung, M. A., Woo, H. A., & Kim, H. J. (2017). PI3K-mTOR-S6K signaling mediates neuronal viability via collapsin response mediator protein-2 expression. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00288

87. Oddo, S. (2012). The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, *4 S*(3), 941–952. https://doi.org/10.2741/s310

88. Patel, M., Day, B. J., Crapo, J. D., Fridovich, I., & McNamara, J. O. (1996). Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron*, *16*(2), 345–355. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80052-5

89. Pahan, K., Sheikh, F. G., Liu, X., Hilger, S., McKinney, M., & Petro, T. M. (2001). Induction of Nitric-oxide Synthase and Activation of NF-κ B by Interleukin-12 p40 in

Microglial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(11), 7899–7905. https://doi.org/10.1074/jbc.M008262200

90. Paravati, S., Rosani, A., & Warrington, S. J. (2021). Physiology, Catecholamines. *StatPearls*. Retrieved fro https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507716/

91. Paoletti, P., & Neyton, J. (2007, February). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011

92. Pedersen, P. L., & Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *Trends in Biochemical Sciences*. https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90090-9

93. Pirovich, D. B., Da'dara, A. A., & Skelly, P. J. (2021, August 11). Multifunctional Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase as a Therapeutic Target. *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.719678

94. Popescu, G., & Auerbach, A. (2003). Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response. *Nature Neuroscience*, *6*(5), 476–483. https://doi.org/10.1038/nn1044

95. Pulido, S. M., Passaquin, A. C., Leijendekker, W. J., Challet, C., Wallimann, T., & Rüegg, U. T. (1998). Creatine supplementation improves intracellular Ca2+ handling and survival in mdx skeletal muscle cells. *FEBS Letters*, *439*(3), 357–362. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01399-4

96. Rambo, L. M., Ribeiro, L. R., Schramm, V. G., Berch, A. M., Stamm, D. N., Della-Pace, I. D., … Royes, L. F. F. (2012). Creatine increases hippocampal Na+,K+-ATPase activity via NMDA-calcineurin pathway. *Brain Research Bulletin*, *88*(6), 553–559. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.06.007

97. Reyes, R. C., Brennan, A. M., Shen, Y., Baldwin, Y., & Swanson, R. A. (2012). Activation of neuronal NMDA receptors induces superoxide-mediated oxidative stress in neighboring neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *32*(37), 12973–12978. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1597-12.2012

98. Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., … Snider, W. D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genetics*, *13*(1), 43–47. https://doi.org/10.1038/ng0596-43

99. Riback, J. A., Katanski, C. D., Kear-Scott, J. L., Pilipenko, E. V., Rojek, A. E., Sosnick, T. R., & Drummond, D. A. (2017). Stress-Triggered Phase Separation Is an Adaptive, Evolutionarily Tuned Response. *Cell*, *168*(6), 1028-1040.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.027

100. Rivera, D. S., Lindsay, C. B., Oliva, C. A., Bozinovic, F., & Inestrosa, N. C. (2021). "Live together, die alone": The effect of re-socialization on behavioural performance and social-affective brain-related proteins after a long-term chronic social isolation stress. *Neurobiology of Stress*, *14*. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100289

101. Roschel, H., Gualano, B., Ostojic, S. M., & Rawson, E. S. (2021, February 1). Creatine supplementation and brain health. *Nutrients*. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu13020586

102. Safari, M. A., Jahromi, M. K., Rezaei, R., Aligholi, H., & Brand, S. (2020). The effect of swimming on anxiety-like behaviors and corticosterone in stressed and unstressed rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(18), 1–19. https://doi.org/10.3390/ijerph17186675

103. Santos, R. V. T., Bassit, R. A., Caperuto, E. C., & Costa Rosa, L. F. B. P. (2004). The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30km race. *Life Sciences*, *75*(16), 1917–1924. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.11.036

104. Saichudin. (2014). Stres Oksidatif Pemicu Utama Kematian Sel Purkinje Otak Kecil (Cerebellum). *Jurnal Sport Science*, *4*(1), 09.

105. Scibior, D., & Czeczot, H. (2006). [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, *60*, 170–80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618987

106. Steptoe, A. (1997). Stress management. In A. Baum, S. Newman, J. Weinman, R. West, & C. McManus (Eds.), Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine (pp. 262-264). Cambridge: Cambridge University Press.

107. Shao, Y., Yan, G., Xuan, Y., Peng, H., Huang, Q. J., Wu, R., & Xu, H. (2015). Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus. *Behavioural Brain Research*, *282*, 201–208. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.00

108. Shim, I. S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D. W., & Usui, K. (2003). Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, *39*(3), 285–292. https://doi.org/10.1023/A:1022861312375

109. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015, October 1). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047

110. Shi, Q., Xu, H., Yu, H., Zhang, N., Ye, Y., Estevez, A. G., … Gibson, G. E. (2011). Inactivation and reactivation of the mitochondrial α-ketoglutarate dehydrogenase complex. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 17640–17648. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.203018

111. Shohami, E., & Biegon, A. (2014). Novel Approach to the Role of NMDA Receptors in Traumatic Brain Injury. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *13*(4), 567–573. https://doi.org/10.2174/1871527311312666019 6

112. Szymonowicz, K., Oeck, S., Malewicz, N. M., & Jendrossek, V. (2018, March 18). New insights into protein kinase B/Akt signaling: Role of localized akt activation and compartment-specific target proteins for the cellular radiation response. *Cancers*. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/cancers10030078

113. Soman, S., Korah, P. K., Jayanarayanan, S., Mathew, J., & Paulose, C. S. (2012). Oxidative stress induced NMDA receptor alteration leads to spatial memory deficits in temporal lobe epilepsy: Ameliorative effects of Withania somnifera and Withanolide A. *Neurochemical Research*, *37*(9), 1915–1927. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0810-5

114. Tan, D. X., Zheng, X., Kong, J., Manchester, L. C., Hardel, R., Kim, S. J., … Reiter, R. J. (2014, September 9). Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms150915858

115. Taniguchi, S., Nakazawa, T., Tanimura, A., Kiyama, Y., Tezuka, T., Watabe, A. M., … Yamamoto, T. (2009). Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behaviour. *EMBO Journal*, *28*(23), 3717–3729. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.300

116. Tian, J., & Xie, Z. J. (2008, July). The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. *Physiology*. https://doi.org/10.1152/physiol.00008.2008

117. Tse, Y. C., Bagot, R. C., Hutter, J. A., Wong, A. S., & Wong, T. P. (2011). Modulation of synaptic plasticity by stress hormone associates with plastic alteration of synaptic NMDA receptor in the adult hippocampus. *PLoS ONE*, *6*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027215

118. Thakur, S., Storewala, P., Basak, U., Jalan, N., & Pethe, P. (2020). Clocking the circadian genes in human embryonic stem cells. *Stem Cell Investigation*, *7*(May). https://doi.org/10.21037/sci-2020-014

119. Tretter, L., & Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: A target and generator of oxidative stress. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 360, pp. 2335–2345). Royal Society. https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1764

120. Turner, C. E., Byblow, W. D., & Gant, N. N. (2015). Creatine Supplementation Enhances Corticomotor Excitability and Cognitive Performance during Oxygen Deprivation. *Journal of Neuroscience*, *35*(4), 1773–1780. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3113-14.2015

121. Viswambharan, H., Carvas, J. M., Antic, V., Marecic, A., Jud, C., Zaugg, C. E., … Yang, Z. (2007). Mutation of the circadian clock gene Per2 alters vascular endothelial function. *Circulation*, *115*(16),2188–2195. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653303

122. Wadhwa, B., Makhdoomi, U., Vishwakarma, R., & Malik, F. (2017, May 1). Protein kinase B: Emerging mechanisms of isoform-specific regulation of cellular signaling in cancer. *Anti-Cancer Drugs*. Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000496

123. Wade, C. A., Goodwin, J., Preston, D., & Kyprianou, N. (2019). Impact of α-adrenoceptor antagonists on prostate cancer development, progression and prevention. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, *7*(1), 46–60. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6420703

124. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., & Schlattner, U. (2011). The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. Springer-Verlag Wien. https://doi.org/10.1007/s00726-011-0877-3

125. Walther, D. J., Peter, J. U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, *299*(5603), 76. https://doi.org/10.1126/science.1078197

126. Wang, X., Zhang, X., Wu, D., Huang, Z., Hou, T., Jian, C., … Cheng, H. (2017). Mitochondrial flashes regulate ATP homeostasis in the heart. *ELife*, *6*. https://doi.org/10.7554/eLife.23908

127. Wang, X. Q., Wang, W., Peng, M., & Zhang, X. Z. (2021, January 1). Free radicals for cancer theranostics. *Biomaterials*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120474

128. Watkins, J. C., & Jane, D. E. (2006, January). The glutamate story. *British Journal of Pharmacology*. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706444

129. Weaver, J., Porasuphatana, S., Tsai, P., Cao, G. L., Budzichowski, T. A., Roman, L. J., & Rosen, G. M. (2002). The activation of neuronal nitric-oxide synthase by various divalent cations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *302*(2), 781–786. https://doi.org/10.1124/jpet.102.035337

130. Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H., & Ahmad, N. (2013, July 10). Circadian rhythm connections to oxidative stress: Implications for human health. *Antioxidants and Redox Signaling*. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4889

131. Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews*. American Physiological Society. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107

132. Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, L. (2020, April 1). Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0

133. Yaguchi, M., Ikeya, S., & Kozaki, A. (2020). The activation mechanism of plant S6 kinase (S6K), a substrate of TOR kinase, is different from that of mammalian S6K. *FEBS Letters*, *594*(4), 776–787. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13661

134. Yogev, O., Naamati, A., & Pines, O. (2011, November). Fumarase: A paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS Journal*. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08359.x

135. Zaidi, A. (2010). Plasma membrane Ca 2+ -ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. *World Journal of Biological Chemistry*, *1*(9), 271. https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i9.271

136. Zampar, G. G., Chesta, M. E., Carbajal, A., Chanaday, N. L., Díaz, N. M., Casale, C. H., & Arce, C. A. (2009). Acetylated tubulin associates with the fifth cytoplasmic domain of Na+/K+-ATPase: Possible anchorage site of microtubules to the plasma membrane. *Biochemical Journal*, *422*(1), 129–137. https://doi.org/10.1042/BJ20082410

137. Zhang, Y., Zhang, Y., & Yu, Y. (2017). Global Phosphoproteomic Analysis of Insulin/Akt/mTORC1/S6K Signaling in Rat Hepatocytes. *Journal of Proteome Research*, *16*(8), 2825–2835. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00140

138. Zhao, J., Zhai, B., Gygi, S. P., & Goldberg, A. L. (2015). MTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(52), 15790–15797. https://doi.org/10.1073/pnas.1521919112

139. Zou, Z., Tao, T., Li, H., & Zhu, X. (2020, March 10). MTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges. *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1

140. Zhuravliova, E., Barbakadze, T., Zaalishvili, E., Chipashvili, M., Koshoridze, N., & Mikeladze, D. (2009). Social isolation in rats inhibits oxidative metabolism, decreases the content of mitochondrial K-Ras and activates mitochondrial hexokinase. *Behavioural Brain Research*, *205*(2), 377–383. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.07.009

141. Zubova, S. G., Shitikova, Z. V., & Pospelova, T. V. (2012). Tor-centric concept of regulation mitogenic, metabolic and energetic signal processing in cell. *Tsitologiya*, *54*(8), 589–602.

გამოქვეყნებული პუბლიკაციები

1. Burjanadze George , Shengelia Mariam , Dachanidze Natalia , Koshoridze Marine , Menabde Ketevan , Tsagareli Sulkhan , Koshoridze Nana (2016). Some Biochemical Changes of Rat Hippocampal Slices under the Long-term Creatine Intraperitoneal Supplementation. International Journal of Biochemistry and Biophysics, 4(4), 45 - 51. DOI: 10.13189/ijbb.2016.040402

2. **Burjanadze, G., Shengelia, M., Dachanidze, N., Mikadze, M., Menabde, K., & Koshoridze, N. (2018). Creatine– facilitated protection of stress caused by disrupted circadian rhythm. *Biological Rhythm Research*, *49*(1), 61–75. https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1333198**

3. Shengelia, M., Burjanadze, G., Koshoridze, M., Kuchukashvili, Z., & Koshoridze, N. (2021). STRESS-AFFECTED AKT/MTOR PATHWAY UPREGULATED BY LONG-TERM CREATINE INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION. *Georgian Medical News*, (313), 134–139

კვლევა განხორციელდა „შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფინანსური მხარდაჭერით “PHDF-18-2240-„ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესი და კრეატინით მისი პრევენციის მექანიზმი“.

სამეცნიერო კონფერენციები

1	თარიღი	2018
	მოხსენების სათაური	Stress related changes in Na^+/K^+-ATPase activity and ways of action of creatine
	კონფერენციის დასახელება	The 18th FEBS Young Scientists' Forum The 43rd FEBS Congress - Biochemistry Forever
	ჩატარების ადგილი	პრაღა, ჩეხეთი
	ელექტრონული მისამართი	https://2018.febscongress.org
2	თარიღი	2017
	მოხსენების სათაური	Psycho-emotional stress induced Ca^{2+}-cytotoxicity in white rat hippocampus and creatine's possible neuroprotecting effect
	კონფერენციის დასახელება	42nd FEBS Congress
	ჩატარების ადგილი	იერუსალიმი, ისრაელი
	ელექტრონული მისამართი	https://2017.febscongress.org/
3	თარიღი	2018
	მოხსენების სათაური	ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესი და მისი პრევენცია კრეატინით
	კონფერენციის დასახელება	IX სამეცნიერო კონფერენცია " ნეირობილოგიის აქტუალური საკითხები"
	ელექტრონული მისამართი	
	ჩატარების ადგილი	თბილისი, ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
4	თარიღი	2019
	მოხსენების სათაური	კრეატინის მოდულატორული როლის შესწავლა კალციუმის რაოდენობრივ ცვლილებებზე ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში
	კონფერენციის დასახელება	საქართველოს ივანე ბერიტაშვილის ფიზიოლოგთა საზოგადოების IV საერთაშორისო ყრილობა
	ელექტრონული მისამართი	https://lifescience.org.ge/news/416--iv-.html
	ჩატარების ადგილი	თბილისი