ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

საბაკალავრო პროგრამა „გამოყენებითი ბიომეცნიერებები და ბიოტექნოლოგია“

ნიკა ათანელოვი

„ საქართველოში გავრცელებული Seike navel-ის ჯიშის ფორთოხლის კანიდან ფლავონოიდური ექსტრაქტის მიღება და მისი ზოგიერთი თვისების შესწავლა „

საბაკალავრო ნაშრომი შესრულებულია ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის, ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის, ბიოლოგიის დეპარტამენტის, ბიოქიმიის მიმართულებაზე გამოყენებითი ბიომეცნიერებებისა და ბიოტექნოლოგიის ბაკალავრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად.

ხელმძღვანელები : ბ.მ.დ. პროფ. **ნანა კოშორიძე**, ბ.დ ასისტ.პროფ. **გიორგი ბურჯანაძე**

თანაავტორები **: ნინო ბერიაშვილი**, **გიორგი კუპრავა**

თბილისი 2018

სარჩევი

ანოტაცია 4

შესავალი 7

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა 11

1.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები 11

1.2 სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა 15

1.3 სტრესი და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი 20

1.4 ფლავონოიდები 22

1.5 სტრესის პრევენცია ფლავონოიდებით 25

თავი II. კვლევის ობიექტები და მეთოდები 28

2.1 კვლევის ობიექტი 28

2.2 ფლავონოიდური ექსტრაქტის მიღება 28

2.3 ქოლესტერინის რაოდენობის განსაზღვრა 30

2.4 ტრიგლიცერიდების რაოდენობის განსაზღვრა 31

2.5 მაღალი და დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების რაოდენობის განსაზღვრა 32

2.6 მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობის განსაზღვრა 34

2.7 Ca^{2+}-ის რაოდენობის განსაზღვრა 35

2.8 აზოტის მონოოქსიდის რაოდენობის განსაზღვრა 36

2.9 სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის განსაზღვრა 36

2.10 კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა 37

2.11 სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა 38

2.12 კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა 39

2.13 ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით 39

2.14 სტატისტიკური ანალიზი 40

თავი III. მიღებული შედეგები 41

3.1 სისხლის ლიპიდური სპექტრის რაოდენობრივი ცვილებების დადგენა 41

3.2 MDA-ს, Ca^{2+}-ისა და NO-ს რაოდენობრივი ცვილებების დადგენა სისხლში 43

3.3 MDA-ს და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილებების დადგენა გულის კუნთის უჯრედებში . 44

3.4 ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის ცვლილება გულის კუნთის უჯრედებში 46

3.5 კრეატინკინაზასა და SDH-ის აქტივობის ცვლილება გულის კუნთის უჯრედებში 48

თავი IV. მიღებული შედეგების განხილვა 50

დასკვნა 54

გამოყენებული ლიტერატურა 55

ანოტაცია

სტრესი თანამედროვეობის განუყოფელი ნაწილია, რომელიც განაპირობებს ადაპტაციური ხასიათის ქცევით და ასევე სხვადასხვა ტიპის ფიზიოლოგიურ პასუხებს ბიოლოგიური სისტემის ჰომეოსტაზის აღდგენის მიზნით. ცნობილია, რომ სტრესის ფონზე მიმდინარე პროცესების საფუძველს უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიური ცვლილება წარმოადგენს, რაც აისახება ორგანიზმის ჰორმონალური სტატუსისა და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებებით, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის რღვევით, ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური სტატუსის დაქვეითებით, ფერმენტების აქტივობის შემცირებით, ტრანსკრიფციული და ტრანსლაციური პროცესების ინტენსივობის ცვლილებებითა და სხვა მნიშვნელოვანი პროცესებით, რაც ხელს უწყობს ორგანიზმში სხვადასხვა ტიპის პათოლოგიების ჩამოყალიბებას. აქედან გამომდინარე, თანამედროვე სამეცნიერო საზოგადოება ორიენტირებულია ისეთი ნივთიერებების მოძიებაზე, რომლებთაც შესწევთ უნარი, მოახდინონ სტრესული პროცესების პრევენცია. ამ მიმართულებით, ჩვენი ყურადღება მიიპყრო ფლავონოიდებმა, რომლებსაც გააჩნიათ მკაფიოდ გამოხატული და ლიტერატურულად დადასტურებული ანტიოქსიდანტური თვისებები.

სამუშაოს მიზანი. ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, კვლევის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ფლავონოიდების პროტექტორული გავლენა სოციალური იზოლაციითა და დღე-ღამური ციკლის ხანგრძლივი დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად განვითარებულ ცვლილებებზე თეთრი ვირთაგვას სისხლა და გულის კუნთის უჯრედებში. ფლავონოიდების გამოსაყოფად საქართველოში გავრცელებული სეიკე ნაველის ჯიშის ფორთოხლის (Sinensis (L). Osbeck N26, Seike Navel) კანიდან გამოყენებული იქნა მრავალსაფეხურიანი ექსტრაქციით წყალში ხსნადი პოლიფენოლური ფრაქციის მიღების მეთოდი. ნანახია, რომ შედეგად მიღებული ფლავონოდიების შემცველი ფრაქციის (GOF) ვირთაგვას ორგანიზმში 7.5 მგ/კგ რაოდენობით ყოველდღიურმა შეყვანამ 30 დღის განმავლობაში, გააუმჯობესა ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად გაუარსებეული ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური მახასიათებლები გულის კუნთის უჯრედებსა და სისხლში. აღსანიშნავია, რომ სტრესის პირობებში GOF–ის შეყვანა დადებითად მოქმედებს ანტიოქსიდანტური სისტემის ზოგიერთი ფერმენტის (SOD, კატალაზა) აქტივობაზე, ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესებზე და სისხლის ლიპიდური სპექტრის რაოდენობრივ

მაჩვენებლების ცვლილებაზე. ამის პარალელურად აღინიშნება Ca^{2+}-ის იონებისა და აზოტის მონოოქსიდის რაოდენობების ნორმალიზაცია. თვალსაჩინო იყო GOF-ის მაკორექტირებელი გავლენა ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართული ზოგიერთი ფერმენტის (სუქცინატდეჰიდროგენაზა, კრეატინკინაზა) აქტივობასთან მიმართებაშიც. შესწავლილი პარამეტრები შედარებული იქნა ასევე ფორთოხლის კანიდან გამოყოფილი ისეთი ფლავონოიდის ეფექტთან, როგორიცაა ნობილეტინი. უნდა აღინიშნოს, რომ ზოგიერთი პარამეტრის შესწავლისას GOF-ი ხასიათდებოდა უკეთესი მონაცემებით ნობილეტინთან შედარებით.

Annotation

Stress is an integral part of modernity that induces several adaptive, behavioral and physiological responses to retrieve homeostasis in biological system. It is known that basis of alterations induced by stress are mainly linked to intracellular biochemical processes that are reflected in changes of hormonal status, quantitative changes of signaling molecules, depletion of energy metabolism, decrease of antioxidant properties of cells, reduction of enzymatic activity and changes in transcriptional and translational intensivity and other important processes that can induce several pathologies and diseases. Consequently, the modern scientific society is focused on finding substances that are capable of preventing stress. At this point it is noteworth mentioning Flavonoids - compounds with literally proven antioxidant properties.

Hence, the goal of the present study was to investigate potentially preventive properties of flavonoids towards oxidative processes and chronic psycho-emotional stress in the blood and cardiac muscle cells of white laboratory rats, induced by long-term social isolation and deprivation of natural cyrcadian rhythm. Isolation of polyphenol extract with significant amounts of flavonoid compounds (Georgian orange flavonoid - GOF) from precocious Georgian Citrus sinensis peel (Citrus sinensis (L.) Osbeck "Seike Navel", form N26) was established by multistage process based on water associated fraction (WAF). It has been shown that daily administration of GOF (7.5 mg/kg) intraperitoneally during 30 days had positive influence on altered biochemical and physiological processes in blood and cardiac muscle cell, induced by chronic psycho-emotional stress. For instance, administration of GOF tends to upregulate activity of enzymes involved in antioxidant system (SOD, Catalase). On the other hand, GOF has positive affect on lipid superoxidation, quantitative changes of blood lipit spectrum, and concentration of intracellular nitric oxide and Ca^{2+} ions. It is noteworthy that administration of GOF also upregulated activities of several enzymes involved in energy metabolism, respectively Succinate dehydrogenase (SDH) and Creatine kinase (CK). Additionaly, properties of Georgian orange flavonoids (GOF) were compared to commercially used flavonoid - Nobiletin, also isolated from citrus sinensis peel. In terms of some parameters, GOF revealed better biological activity than Nobiletin.

შესავალი

სტრესი ანუ „ორგანიზმის არასპეციფიური პასუხი გარეგან ცვლილებაზე“ და მისი მოქმედების ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური შესწავლა, თანამედროვე მეცნიერების ერთ-ერთ ძირითად მიზანს წარმოადგენს. მიუხედავად იმისა, რომ მსგავსი ზემოქმედება ხშირ შემთხვევაში აუცილებელი ფაქტორია მრავალი ადაპტაციური პროცესისთვის, ზოგადად სტრესი არღვევს რა ორგანიზმის სხვადსხვა სისტემის ნორმალური მოქმედების რიტმს, იგი უარყოფითად აისახება მათ ფუნქციონირებაზე. სტრესის უარყოფითი ეფექტის მიზეზი ორგანიზმში გამოიხატება მთელი რიგი ფერმენტული სისტემების აქტივობის, ორგანიზმის ჰორმონალური სტატუსისა და ბიოლოგიურად აქტიური მოლეულების რაოდენობრივ ცვლილებაში, ასევე ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევაში, გენეტიკური აპარატის გააქტივებასა და სხვა, მნიშვნელოვან პროცესებში. აღსანიშნავია, რომ სტრესული ფაქტორების ხანმოკლე ზემოქმედება იწვევს რა უჯრედების გააქტივებას, იგი დადებითად აისახება მათ ფუნქციურ მდგომარეობაზე. თუმცა, სტრესის გახანგრძლივების შედეგად განვითარებული მეტაბოლური ცვლილებები ხშირ შემთხვევაში სხვადასხვა პათოლოგიური პროცესის გამომწვევ ფაქტორად გვევლინება.

ცნობილია, რომ ორგანიზმის სხვადასხვა სისტემა განსხვავებული მგრძნობელობით ხასიათდება სტრესული პირობებისადმი, ამ კუთხით განსაკუთრებით აღსანიშნავი არის გულ-სისხძლარღვთა სისტემა. თანამედროვე შეხედულებებითა და მონაცემებით, მრავალი გულ-სისხლძარღვოვანი დაავადების, მათ შორის : გულის კორონალური დაავადებების, კარდიომიოპათიების, არითმიების და სხვა.

უჯრედში სტრესის ზემოქმედების საბოლოო ეტაპად მიიჩნევა მასში მიმდინარე ჟანგვითი პროცესების გაძლიერება და ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბება, რაც, თავის მხრივ, ცილოვანი მოლეკულების, მათ შორის ფერმენტების სტრუქტურულ და ფუნქციურ ცვლილებებსა და ლიპიდების შემადგენლობაში არსებული ცხიმოვანი მჟავების, განსაკუთრებით კი უჯერი ცხიმოვანი მჟავების, გაძლიერებული ჟანგვის (ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის) ინტენსიფიკაციას იწვევს. სტრესის ზემოქმედების პროცესში, განსაკუთრებით ყურადსაღებია სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებისა და ასევე იონების, მათ შორის Ca^{2+}-ის იონების რაოდენობის ზრდა, რაც უარყოფით გავლენას ახდენს

ზოგადად უჯრედის და მათ შორის, გულ-სისხლძარღვთა სისტემის შემადგენლობაში წარმოდგენილი უჯრედული პოპულაციების ფუნქციონირებაზე.

აღნიშნული ეფექტების გამომწვევი სტრეს-ფაქტორები საკმაოდ მრავალფეროვანი სპექტრით არის წარმოდგენილი, რომელთა შორის აღსანიშნავი არის ე.წ. სოციალური იზოლაცია, რომელიც ფსიქო-სოციალური სტრესის ჩამოყალიბებას უწყობს ხელს. აღსანიშნავია, რომ სწორედ სოციალური ურთიერთობები წარმოადგენს ერთ-ერთ გადამწყვეტ ფაქტორს ინდივიდების განვითარებასა და ნორმალურ ცხოველქმედებაში, მათ შორის ადამიანების შემთხვევაშიც. დადასტურებულია, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციით გამოწვეული ფსიქო-სოციალური სტრესი ორგანიზმში მიმდინარეობს სხვადასხვა ნეიროტრანსმიტერებისა და გლუკოკორტიკოიდული ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებების ფონზე, რაც, თავის მხრივ, გავლენას ახდენს ორგანიზმის საერთო მდგომარეობაზე, მათ შორის გულ-სისხლძარღვოვანი სისტემის გამართულ ფუნქციონირებაზე, მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესებზე და ა.შ.

ცნობილია, რომ ჰორმონებისა და არაერთი ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთის სამიზნეს წარმოადგენს უჯრედთა პლაზმურ მემბრანაზე არსებული რეცეპტორები, რომელთა სტრუქტურული და ფუნქციური სახის ცვლილებები განსაზღვრავს სიგნალის ტრანსდუქციის, სასიგნალო კასკადის მიმართულების და საბოლოოდ გენერირებული ეფექტების თავისებურებებს. ორგანიზმზე სტრესის მოქმედება, ძირითად შემთხვევაში გამოიხატება უჯრედშიდა სასიგნალო სისტემაში მიმდინარე ცვლილებებში, რაც ძირითადად სრულდება ციტოტოქსიური ეფექტის მქონე ოქსიდაციური პროცესების სტიმულირებით, რაც სისტემურ დონეზე სხვადასხვა ხასიათის მქონე პათოლოგიური პროცესის განვითარებაში გამოიხატება.

სტრესის ფონზე მიმდინარე ფიზიოლოგიური პროცესებისა და პათოლოგიური მოვლენების ძირითად საფუძველს წარმოადგენს ბიოქიმიური ალტერაციები, რაც ძირითადად გამოიხატება ძირითადი სასიგნალო სისტემების ცვალებადობაში, ჰორმონალური სტატუსისა და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებაში, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევაში, ანტიოქსინდატური სისტემების ფუნქციონირების ალტერაციაში, ფერმენტული სისტემების აქტივობის შემცირებაში, გენეტიკურ აპარატში მიმდინარე, მათ შორის ტრანსკრიპციული და ტრანსლაციური, პროცესების ინტენსივობის დაქვეითებაში და სხვა მნიშვნელოვან პროცესებში [1,2]. ასეთი ცვლილებების გათვალისწინებით, ისეთი ნივთიერებების მოძიება, რომლებიც პოტენციურად მოახდენენ სტრესის პრევენციას, განსაკუთრებულად პრიორიტეტულია. დღესდღეობით ცნობილია მთელი რიგი ნაერთებისა,

რომლებიც ამ მიზნით აქტიურად გამოიყენება პრაქტიკაში, მათ შორის განიხილება ანტიოქსიდანტური თვისებების მქონე ნაერთები, რომელთაც ფლავონოიდები ეწოდება.

ფლავონოიდები, როგორც მცენარეებისა და სოკოების მეორეული მეტაბოლიტები, ადამიანის საკვები რაციონის დანამატებს შორის, ყველაზე ხშირად მიღებულ პოლიფენოლურ ნართებს წარმოადგენენ. დადასტურებულია, რომ ფლავონოიდებს გააჩნიათ ანტიოქსიდანტური, ანტიკანცეროგენული, ანტიინფლამაციური და ანტიმიკრობული თვისებები. მაგალითისთვის, ლიტერატურული მონაცემებით ცნობილია, რომ საკვები დანამატის სახით მიღებული ფლავონოიდები ამცირებს კუჭის კარცინომისა და სიგარეტის მოწევით განპირობებული სიმსივნეების რისკებს. ნაჩვენები არის, რომ ფლავონოიდების ზოგიერთი წარმომადგენელი ანტიინფლამაციური თვისებებით ხასიათდებიან, რომლის ფარგლებში ისინი ახდენენ არაქიდონის მჟავის სასიგნალო გზების მოდულირებას, სპეციფიური გენების ექსპრესიის ინჰიბირებასა და საჭიროებისამებრ ანტი-ინფლამაციური მედიატორებისა და ციტოკინების გამომუშავების სტიმულირებას [3,4].

რაც შეეხება ფლავონოიდების ანტიოქსიდანტურ თვისებებს, ნანახი არის რომ მათი მოქმედებით ადგილი აქვს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ნორმალიზირებას ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივაციის გზით. ფლავონოიდებს გააჩნიათ რა უნარი მოახდინონ ჟანგბადის აქტიური ფორმებისა და აზოტის შემცველი აქტიური რადიკალების ინჰიბირება, ამასთან ერთად მათ შეუძლიათ იმ ფერმენტების აქტივობის დაქვეითება, რომლებიც მონაწილეობას იღებენ თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის პროცესში, მათ შორის : ციკლოოქსიგენაზა, ლიპოოქსიგენაზა და ინდუციბელური ტიპის აზოტის მონოოქსიდის სინთაზა, რაშიც გამოიხატება მათი ანტიოქსიდანტური თვისებები [4,5].

ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობის დაქვეითების მიზეზს შესაძლებელი არის რომ წარმოადგენდეს ნებისმიერი სახის ხანგრძლივი პერიოდით მიმდინარე სტრესი, მათ შორის ჩვენი ყურადღება მიიპყრო სოციალურმა იზოლაციამ, რომელიც მიმდინარეობს ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში. ამ პროცესისთვის დამახასიათებელი არის მთელი რიგი ბიოქიმიური პროცესების ალტერაციები, კერძოდ კი ადგილი აქვს როგორც ანტიოქსიდანტური სისტემის, ასევე ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართული ენზიმების აქტივობის დაქვეითებას, რაც გამოიხატება ATP-ის დეფიციტითა და გულის კუნთის ენერგეტიკული პოტენციალისა და ფუნქციური მდგომარეობის დაქვეითებით, უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შემცირებით, აპოპტოზური და ნეკროზული პატერნების გაძლიერებით, იონების რაოდენობრივი შემცველობის ცვლილებებითა და სხვა [1].

ყოველივე ამის გათვალისწინებით, ჩვენი ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ხანგრძლივი ცირკადური რიტმის დარღვევითა და სოციალური იზოლაციით გამოწვეული სტრესის პირობებში ვირთაგვას გულის კუნთის უჯრედებსა და სსიხლში მიმდინარე მეტაბოლური ცვლილებების პრევენცია სეიკე ნაველის ჯიშის ფორთოხლის კანიდან მიღებული ფლავონოიდების სუმარული ექსტრაქტით (GOF).

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები

სტრესი, როგორც ორგანიზმის ჰომეოსტაზის შენარჩუმებისადმი მიმართული ადაპტაციური რეაქცია, ერთ-ერთმა პირველმა განიხილა კანადელმა ფიზიოლოგმა ჰანს სელიემ [6]. ის სტრესს განმარტავდა როგორც ორგანიზმის სტერეოტიპულ, ფიზიოლოგიურად დაპროგრამებულ, არასპეციფიური რეაქციების ერთობლიობას, რომელიც ინდუცირდებიან ძლიერი ზემოქმედების შედეგად, საბოლოოდ კი ორგანიზმის დამცავი ძალების გარდაქმნებს განაპირობებს. სელიეს მიერ შემოთავაზებული განმარტება არ არის სრულყოფილი, რადგან ის სრულად არ ასახავს სტრესის გამომწვევ ფაქტორებსა და იმ გარემოებას, რომ ორგანიზმის პასუხი სტრესთან მიმართებაში, ერთი მხრივ, ორგანიზმის ფუნქციურ მდგომარეობაზე არის დამოკიდებული [7].

სტრესის უფრო მრავლისმომცველი განმარტება შეძლო ფურდუემ მიერ, რომელიც სტრეს მიიჩნევდა ორგანიზმის არასპეციფიური ბიოქიმიური, ფიზიოლოგიური და ფსიქოლოგიური რეაქციების ერთობლიობად სხვადასხვა ხასიათის და ბუნების გამღიზიანებლის მოქმედების საპასუხოდ, ხოლო სტრესის გამომწვევ ტრიგერად კი ძირითადად იმ ორგანოების ფუნქციურ დატვირთვას მიიჩნევდა, რომლებიც გაერთიანებულნი არიან არასპეციფიური ტიპის ფუნქციურ გაერთიანებაში და უზრუნველყოფენ ორგანიზმის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებას ან/და მის ადაპტაციას [8]. ამჟამად, ყველაზე რელევანტური სტეპტოუს მიერ შემოთავაზებული განმარტებაა, რომლის თანახმადაც სტრესის მიმართ პასუხი აღმოცენდება და რეალიზირდება მაშინ, როცა ინდივიდისადმი წაყენებული მოთხოვნები აღემატება იმ პერსონალურ და სოციალურ რესურსებს, რომლის მობილიზაციის უნარიც პოტენციურად უნდა შესწევდეს მას [9].

თავდაპირველად მიაჩნდათ, რომ სტრესს ორგანიზმზე ყოველთვის უარყოფითი გავლენა ჰქონდა. თუმცა, მოგვიანებით სელიემ სტრესის გამომწვევი ფაქტორების - სტრესორების ბუნებისა და მათი ზემოქმედების ხასიათის მიხედვით გამოყო სტრესის ორი ტიპი, კერძოდ დადებითი და უარყოფითი სტრესი. ამასთან, სწორედ მან შემოიღო განმარტებები, რომელთა მიხედვითაც დადებით სტრესს ეუსტრესი უწოდა, ხოლო უარყოფითს – დისტრესი [7].

სელიეს მიხედვით, ეუსტრესს ორი ფუნქციური დატვირთვა გააჩნია. ერთი მხრივ, იგი გამოწვეულია დადებითი ემოციებით და არ არის ძლიერი, იწვევს რა ორგანიზმის მობილიზებას. რაც შეეხება დისტრესს, ის წარმოადგენს სტრესის ისეთ ფორმას, რომელთან გამკლავება ორგანიზმის უნარებს აღემატება, რაც ხშირად მწვავე სომატური და ფსიქიკური დაავადებების გამოწვევით სრულდება [6 ; 10].

ზემოქმედების ტიპის მიხედვით სტრესი შეიძლება იყოს:

1. ფიზიოლოგიური/სისტემური - უპირატესად გამოხატავს ბიოლოგიური სისტემების დაძაბულობას, მას თან ახლავს ორგანიზმის ფიზიოლოგიური და ქცევითი ცვლილებების კომპლექსი.
2. ფსიქიკური - ჩნდება ნებისმიერი ზემოქმდების შედეგად, რომელიც მოიცავს ინდივიდის ემოციურ სფეროს.

სტრესის განვითარებასა და ჩამოყალიბებაში განარჩევენ სამ ძირითად ფაზას:

1. საბრძოლო განგაში - *სტადია,* რომელიც მიმდინარეობს ორგანიზმის შინაგანი და გარეგანი ძალების მობილიზაციის ფონზე და გულისხმობს იმას, 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 ინტესიფიკაცია, რის პარალელურადაც ადგილი აქვს პათოლოგიური პროცესების განვითარებას, რაც გამოიხატება ისეთი დაავადებების ჩამოყალიბებასა და განვითარებაში, როგორიცაა ნეიროდეგენერაციული ცვლილებები, საჭმლის მომნელებელი სისტემის ფუნქციონირების მოშლა, იმუნური სისტემის დაქვეითება, გულ-სისხლძარღვთა სისტემის პათოლოგიები და სხვა. ეს ცვლილებები შეიძლება ისეთი მნიშვნელობის იყოს, რომ ბიოლოგიური სისტემის სიცოცხლისუნარიანობა კითხვის ნიშნის ქვეშ დააყენოს. იმ შემთხვევაში, თუ ორგანიზმმა დაძლია პირველი ფაზა, ვითარდება შემდგომი, რეზისტენტობის ფაზა.

2. რეზისტენტობის (აქტივაციის) ფაზა - ადგილი აქვს გლუკოკორტიკოიდების მონაწილეობით ორგანიზმის გამძლეობის გაზრდას არასასურველი ზემოქმედების მიმართ.

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, რომლებიც, თავის მხრივ, დაცვის ჰორმონებს წარმოადგენენ, რასაც მოსდევს ორგანიზმის მდგომარეობის გაუარესება და დამძიმება [7 ; 11 ; 12].

არსებობს სტრესის გამომწვევი უამრავი ფაქტორი, ყოველი მათგანი სტრესორის სახელითაა ცნობილი. ეს ფაქტორები შესაძლებელია იყოს გარეგანი (გარემო არეს დაბინძურება, ემოციური ფონი, ხმაური, ულტრაიისფერი გამოსხივება და სხვ.) ან შინაგანი (აუტოიმუნური დაავადებები, შაქრებისა და ქოლესტერინის შემცველობის ცვლილება სისხლში, ჰიპერსენსიტიურობა, ჰორმონალური სტატუსის რღვევა, მინერალების ნაკლებობით გამოწვეული დეპრესია, არასწორი კვება და სხვ.). შესაბამისად, სტრესის სხვადასხვა ფორმა ერთმანეთისაგან განსხვავდება ორგანიზმში მიმდინარე ბიოქიმიური ცვლილებების მიხედვით, რისი მიხედვითაც განასხვავებენ რამდენიმე ტიპის სტრესს, კერძოდ :

- ქრონიკული სტრესი, რომელიც ვითარდება ორგანიზმზე მუდმივი დაძაბულობის (ფიზიკური ან მორალური) საპასუხოდ, რაც იწვევს ძლიერ ზემოქმედებას ინდივიდზე.
- მწვავე სტრესი, რომელიც წარმოადგენს კონკრეტული მდგომარეობის, მაგალითად კონფლიქტის ან ჩხუბის შედეგს.
- ფიზიოლოგიური სტრესი, როგორც ძლიერი ფიზიკური დატვირთვის ან გარეგანი ფაქტორების (ტემპერატურა, ხმაური და ა.შ.) შედეგი.
- ფსიქოლოგიური სტრესი, რომელიც ვითარდება ინდივიდზე ფსიქოლოგიური ზემოქმედებით.
- ინფორმაციული სტრესი, რომელიც წარმოადგენს ჭარბი ინფორმაციული ნაკადის ან პირიქით, ინფორმაციული ნაკლებობის შედეგს [13].

მიუხედავად ასეთი მრავალფეროვნებისა, ნებისმიერი სტრესორის ზემოქმედებაზე ორგანიზმის საპასუხო რეაქციები თითქმის იდენტურია. მაგალითად, სტრესის შედეგად ერთ–

ერთ პირველ რეაქციას წარმოადგენს თირკმელზედა ჯირკვლიდან კატექოლამინებისა და კორტიკოსტრეოიდების გამოყოფის ინტენსიფიცირება.

XX საუკუნის 80-იან წლებში სტრეს-ფაქტორთა სიას დაემატა ე.წ. სოციალური იზოლაცია. 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 სოციალური იზოლაციის უარყოფითი გავლენა ორგანიზმზე, მის ფუნქციონირებასა და სიკვდილიანობის მაჩვენებელზე. სოციალური იზოლაცია ემოციური და ფსიქოლოგიური პრობლემების გამომწვევ ერთდროულად პოტენციურ მიზეზს წარმოადგენს. როგორც სიმპტომი, იზოლაციის პერიოდი შეიძლება იყოს ქრონიკული ან ეპიზოდური და დამოკიდებულია ამ ხასიათის ცვლილებების ფორმებზე [14 ; 15].

დადგენილია, რომ სოციალური იზოლაცია გავლენას ახდენს ორგანიზმის ფუნქციონირების მარეგულირებელ 3 ძირითად სისტემაზე, კერძოდ : ნერვულზე, ენდოკრინულსა და იმუნურზე. ცნობილია, რომ სოციალური იზოლაციით გამოწვეული სტრესის შედეგად ვითარდება მთელი რიგი შემეცნებითი ფუნქციის დარღვევები, რასაც მოსდევს გარკვეული პათოლოგიური პროცესების განვითარება. მაგალითად, სოციალური იზოლაციის შედეგად ინდივიდებში იზრდება სხვადასხვა სახის ონკოლოგიური დაავადებების ალბათობა და ა.შ [16].

სტრესის განვითარების რისკ-ფაქტორს ასევე მიეკუთვნება ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა. ცირკადული რიტმის ცნება შემოიღო ამერიკელმა ფიზიოლოგმა ფრანც ჰალბერგმა. იგი მომდინარეობს ლათინური სიტყვიდან „circa dies", რაც ნიშნავს „დღის შესახებ". ცირკადული რიტმი რეგულირდება თავის ტვინში, კერძოდ კი ჰიპოთალამუსში, კონკრეტულად კი სუპრაქიაზმურ ბირთვში, რომელიც ძილ-ღვიძილის ციკლის რეგულირებასთან ერთად ახორციელებს და სხეულის ტემპერატურას რეგულაციასაც. ყოველი ცოცხალი ინდივიდი განიცდის დღე-ღამის ბუნებრივი რიტმის ზემოქმედებას, რომელიც ცოცხალი სისტემის ორგანიზაციის უჯრედულ, ორგანოთა, ორგანიზმულ და პოპულაციურ დონეებზე ვლინდება [17]. არტერიული წნევა, მეტაბოლური პროცესები, გულის ცემის სიხშირე, სხეულის ტემპერატურა და ჰორმონალური აქტივობა, შინაგანი საათის მიხედვით იცვლება. გარდა ამისა, ცირკადული რიტმი არეგულირებს მრავალი გენის ექსპრესიას ქსოვილსპეციფიური ეფექტებით და წარმოადგენს უჯრედული მეტაბოლიზმის ერთ-ერთ მთავარი რეგულატორს, როგორც სტრეს-ფატორების, ასევე სხვა მრავალი ფაქტორის

ზემოქმედების საპასუხოდ. ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ცვლილებას შეუძლია გამოიწვიოს ისეთი პათოლოგიები, რომლებიც დაკავშირებულია გულ-სისხლძარღვთა სისტემასთან და სხვა [18].

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

1.2 სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა

ცნობილია, რომ ნებისმიერი სახის სტრესს შეუძლია ცოცხალ ორგანიზმში გამოიწვიოს მთელი რიგი მეტაბოლური პროცესების ცვლილება, რაც შესაბამისად განაპირობებს თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნას, უჯრედშიდა კალციუმის რაოდენობრივ ცვლილებებას, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითებასა და სხვა მნიშვნელოვან უჯრედულ ცვლილებებს.

ორგანიზმში მიმდინარე მრავალ სასიცოცხლო პროცესთა შორის განსაკუთრებული ადგილი თავისუფალ რადიკალური ჟანგვას უკავია. თავისუფალი რადიკალი წარმოადგენს მოლეკულას, რომელსაც აქვს გაუწყვილებელი ელექტრონი გარე ელექტრონულ ორბიტალზე და ხასიათდება მაღალი რეაქციის უნარიანობით. თავისუფალი რადიკალების მუდმივი კონცენტრაცია უჯრედში , როგორც წესი მიზერულია.

ორგანიზმში თვისუფალი რადიკალები შეიძლება დავყოთ ორ ძირითად ჯგუფად : ბუნებრივი და გარეშე ფაქტორებით წარმოქმნილ რადიკალებად. ამ უკანასკნელთა წარმოქმნის ინდუცირება ხდება ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მოქმედებით. მაგალითად, მაიონიზირებელი და ულტრაიისფერი რადიაცია, ქსენობიოტიკები და ა.შ.

ბუნებრივი რადიკალები, თავის მხრივ, იყოფა სამ ძირითად ჯგუფად : პირველად, მეორეულ და მესამეულ რადიკალებად. პირველად რადიკალებს მიეკუთვნება სუპეროქსიდი

(·OO-), ნიტროქსიდი (NO), უბიქინონი (·Q). სუპეროქსიდის მეტაბოლური გარდაქმნის შედეგად შეიძლება წარმოიქმნას აქტიური მოლეკულური ნაერთები, მაგ : წყალბადის ზეჟანგი, ჰიპოქლორიდი და ლიპიდების ჰიდროზეჟანგი [19 ; 20 ; 21].

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 [22 ; 23].

თავისუფალი რადიკალების ჭარბი რაოდენობა აზიანეს ცილებს, თავისუფალ ამინომჟავეებს, ლიპიდებს, ლიპოპროტეინებს, ნუკლეინის მჟავებს, იწვევენ ლიპიდების ზეჟანგვით დაჟანგვას, რაც ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას, უჯრედის დაზიანებასა და საბოლოოდ ბიოლოგიური სისტემის დაღუპვას იწვევს. უჯრედის დაღუპვა ლიპიდების პეროქსიდაციიას, ძირითადად განპირობებულია თავისუფალი რადიკალების სიჭარბით, რომლებიც აზიანებენ უჯრედულ სტრუქტურებს, განსაკუთრებით პლაზმურ მემბრანას, განაპირობებენ რა მისი ნორმალური ფუნქციონირების რღვევას. აღსანიშნავია, რომ პეროქსიდაციის პროცესი ორგანიზმში მუდმივად მიმდინარეობს, რასაც განსაკუთრებული მნიშვნელობა გააჩნია, ვინაიდან მისი საშუალებით ხდება დაბერებული და დაავადებული უჯრედებისა ელიმინაცია, მოლეკულების დაშლა და მათი აკუმულაციის არიდება. მაშინ, როცა მსგავსი პროცესები აქტვიბოსი განსაკუთრებულ ზღურბლს აღწევენ, ვითარდება ოქსიდაცური სტრესი.

ორგანიზმში მუდმივად მიმდინარეობს თავისუფალი რადიკალების მიმოცვლის პროცესები, მათთან ერთად კი ასეთი პროცესების ხელშემწყობი ფაქტორების, ანუ პროოქსიდაციური ფაქტორების გაძლიერება, რაც განაპირობებს ორგანიზმის ჰომეოსტაზის მოშლასა და მრავალი პათოლოგიური პროცესის ჩამოყალიბებას. პროოქსიდაციური სტატუსის თავიდან ასაცილებლად ორგანიზმში გენეტიკური აპარატის მძლავრი კონტროლის ქვეშ, დეტერმინირებული არის ანტიოქსიდანტური სისტემა, რომელიც არეგულირებს უჯრედში თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის ინტენსივობას, ხოლო მათი რაოდენობის მატების შემთხვევაში, ახდენს აქტიური რადიკალების გაუვნებელყოფას სპეციფიური მექანიზმებით. ცოცხალი სისტემის ანტიოქსიდანტური სისტემა წარმოდგენილია ფერმენტული და არაფერმენტული კომპონენტებით, რომლებიც ბოჭავენ უჯრედში ჭარბი რაოდენობით

წარმოდგენილ თავისუფალ რადიკალებს და განაპირობებენ მათ განეიტრალებას. ნორმაში პროოქსიდანტური და ოქსიდანტური სისტემის აქტივობა წონასწორობაშია. ანტიოქსიდანტური სისტემის ენზიმებს შორის აღსანიშნავია : სუპეროქსიდ დისმუტაზა, კატალაზა, გლუტათიონი პეროქსიდაზა, გლუტათიონ რედუქტაზა და სხვა [24].

სუპეროქსიდ დისმუტაზა (SOD) წარმოადგენს ანტიოქსიდანტური სისტემის ერთ-ერთ ძირითად ფერმენტს, რომელიც ახდენს პეროქსიდაციის პროცესში წარმოქმნილი სუპეროქსიდის დისმუტაციას ჟანგბადად და წყალბადის ზეჟანგად, რის გამოც იგი გვხვდება პრაქტიკულად ყველა ცოცხალ ორგანიზმსა და უჯრედში, თუმცა გამონაკილლს წარმოადგენს რამდენიმე ტიპის ბაქტერია, რომლებიც სუპეროქსიდის დასაშლელად იყენებს სხვა მექანიზმს, მაგ : *Lactobacillus plantarum*.

$$O^{2-} + O^{2-} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

სუპეროქსიდ დისმუტაზას აღმოჩენა 1968 წელს ირვინ ფრიდოროვიჩისა და ჯო მაკკორდის მიერ მოხერხდა დიუკის უნივერსიტეტში. ენზიმი თავდაპირველად უცნობი ფუნქციის მქონე მეტალოპროტეინის სტატუსით სარგებლობდა, რომელსაც ანტი-ინფლამაციური მიზნებისთვის ვეტერინარიაში მოიხმარდნენ. მოგვიანებით, გახდა რა ცნობილი ფერმენტის ბუნება, ცნობილია რომ არსებობს სოდ-ის 3 ძირითადი ოჯახი, რომლებიც განსხვავდებიან ლოკალიზაციით, ცილის ფოლდირების პატერნებითა და კოფაქტორის ბუნებით. პირველ ოჯახს მიეკუთვნება რკინა/სპილენძ დამოკიდებული სოდ-ი, ანუ Cu/Zn-SOD. ფერმენტის ეს ფორმა პრაქტიკულად ყველა უკარიოტულ უჯრედში არის წარმოდგენილი, რომელიც დიმერული ტიპის ცილაა და შედგება 2 სუბერთეულისგან, თითოეული მათგანი მასით 16 კილო/დაკტონი. ყოველი სუბერთეული 153 ამინომჟავითაა წარმოდგენილი, რომლებიც ერთმანეთთან კავშირს ამყარებს ამინომჟავა ცისტეინის 2 ნაშთს შორის წარმოქმნილი დისულფიდური ხიდაკების მეშვეობით. Cu/Zn-SOD-ის, ანუ SOD1-ის, მაკოდირებელი გენის ექსპერსია ძირითადად ინდუცირდება ოქსიდაციური სტრესის მედიატორების, სულფჰიდრილური ანტიოქსიდანტების, ინტერლეიკინ 1-ისა და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი ალფა-ს მეშვეობით. Cu/Zn დამოკიდებულ სოდ-ს შორის, ასევე აღსანიშნავი არის ენზიმის ექსტრაცელულარული ფორმა, იგივე SOD3, რომელიც ჰომოტეტრამერს წარმოადგენს მოლეკულური მასით 30 კილო/დალტონი [25,26,27].

სოდ-ის მეორე ოჯახში წარმოდგენილი არის, ერთი მხრივ, მაგნიუმ-დამოკიდებული სოდ-ი (Mn-SOD), რომელიც ძირითადად ლოკალიზირებულია პრაქტიკულად ყველა ეუკარიოტული უჯრედის მიტოქონდრიის მატრიქსში, ასევე ის გვხვდება არაერთ ბაქტერიაში. ფერმენტი ჰომოტეტრამერია, მოლეკულური მასით 80 კილო/დალტონი. მეორე მხრივ, მე-2 ოჯახში წარმოდგენილი არის რკინა-დამოკიდებული იზოფორმა (Fe-SOD), რომელიც, ერთი მხრივ, მრავალ ბაქტერიაში გვხვდება, მეორე მხრივ, ის მცენარეული უჯრედების ქლოროპლასტებშია წარმოდგენილი [25 ; 27].

რაც შეეხება სოდ-ის მე-3 ოჯახს, აქ წარმოდგენილი არის ნიკელ დამოკიდებული სოდ-ი, ანუ Ni-SOD, რომელიც ჰექსამერული ცილაა და პროკარიოტებშია წარმოდგენილი. აღსანიშნავია, რომ ფერმენტის ამ იზოფორმას ხშირად დიაგნოსტიკაში იყენებენ [28].

ანტიოქსიდანტური სისტემის ერთ-ერთ ძირითად ფერმენტს ასევე წარმოდგენს კატალაზა, რომელიც აკატალიზირებს ბიოლოგიური ჟანგვის შედეგად წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგის დაშლას : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. ფერმენტი გვხვდება ყველა ტიპის ორგანიზმში და აქტიურადაა ჩართული ქსოვილოვანი სუნთქვის პროცესში. ქიმიური აგებულებით წარმოადგენს ჰემოპროტეინს, ტეტრამერია, თითოეული სუბერთეული შეიცავს 500 ამინომჟავურ ნაშთს, სადაც თითოეული მათგანი პროსთეტული ჯგუფის სახით შეიცავს სამვალენტია რკინას (Fe^{3+}). ფერმენტის ცილოვანი ნაწილი სახეობრივად სპეციფიურია [29 ; 30].

კატალაზას უჯრედული ფუნქციონირება საკმაოდ მრავალფეროვანია. დაწყებული მისი უნარით, მოახდინოს წყალბადის ზეჟანგის დაშლა, რომელიც საკმაოდ საშიში მეტაბოლიტია უჯრედისათვის, კატალაზას ბევრი სხვა ფუნქცია გააჩნია. ცნობილია, რომ, როგორც წესი, კატალაზა უჯრედში მოთავსებული არის სპეციალურ ორგანელებში, რომელთაც პეროქსისომები ეწოდებათ. ნაჩვენებია, რომ პეროქსისომებთან ასოცირებული კატალაზას როლი საკმაოდ დიდი არის მცენარეულ უჯრედში ფოტორესპირაციის დროს, ასევე მრავალ მიკროორგანიზმში აზოტის სიმბიოტური ფიქსაციის პროცესში და ა.შ [29 ; 31].

საინტერესოა კვლევები, რომლებიც მეტწილად ცხადყოფს კატალაზას მნიშვნელობას ბიოლოგიური სისტემის გამართულ ფუნქციონირებასთან მიმართებაში. ცნობილია, რომ კატალაზას მაკოდირებელი გენით ნოკაუტირებულ თაგვებში, საკმაოდ ხშირად ვითარდება პათოლოგიური სიმსუქნე, მე-2 ტიპის დიაბეტი, ღვიძლის ლეთალური პათოლოგიები. ცნობილია, რომ ალკოჰოლ დეჰიდროგენაზას მსგავსად, ფერმენტ კატალაზასაც გააჩნია ეთანოლის აცეტალდეჰიდად გარდაქმნის უნარი, თუმცა ამ რეაქციის ფიზიოლოგიური

მნიშვნელობა სადაოა. საინტერესოა, რომ კატალაზას მაკოდირებელი გენის ექსპრესიის შემცირებასთან არის დაკავშირებული გაჭაღარავების პროცესი, რომელიც ჩართული არის პიგმენტ მელანინის ცვლის პროცესში [32].

ბიოლოგიური სისტემის ანტიოქსიდანტური სისტემა ფერმენტების გარდა, წარმოდგენილია ასევე ზოგიერთი ნაერთითა და მინერალით, რომელთა როლი სისტემის ნორმალურ ფუნქციონირებაში ხშირად კრუციალურია. ასეთ ნაერთებს მიეკუთვნება 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 დეფიციტი პირველ რიგში აისახება იმუნური სისტემის ფუნქციონირებაზე [33 ; 34; 35; 36].

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 100 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 ინფექციური აგენტის მიმართ [37 ; 38; 39].

1.3 სტრესი და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი

ცნობილია, რომ ყველა უჯრედი ცხოველქმედებისათვის საჭიროებს ენერგიას, რომლის ძირითად წყაროს წარმოადგენს ატფ. ნორმალურ პირობებში ატფ-ის 95% სინთეზირდება მიტოქონდრიაში ჟანგვითი ფოსფორილირების გზით. დარჩენილი 5% წარმოიქმნება გლიკოლიზის შედეგად. უჯრედის ყოველგვარი აქტივობა ხორციელდება ატფ-ის ჰიდროლიზის შედეგად გამონთავისუფლებული ენერგიის ხარჯზე. სტრესი, თავისი არსით, საკმაოდ დიდ გავლენას ახდენს როგორც უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე, ასევე მისი რეგულაციის სხვადასხვა მექანიზმზე [40].

პირველ რიგში, აღსანიშნავი არის სტრესის გავლენა იმ სტრესულ სიტუაციებთან ასოცირებულ ჰორმონებზე, რომლებიც ენერგეტიკული ბალანსის რეგულაციას ახორციელებენ. ცნობილი არის, რომ სტრესის მრავალფეროვანი ბუნების მიუხედავად, სტრესული სიტუაციისა თუ ფაქტორის შესახებ, ერთ-ერთი პირველი, ინფორმაცია გადაეცემა ჰიპოთალამუსში მოთავსებულ პარავენტრიკულურ ბირთვს (PVN), რომლის დორსალური და სუბმაგნოცელულარული უბნები აგზავნის პროექციებს ტვინის ღეროსა და ზურგის ტვინის სხვადასხვა ბირთვში, რისი მეშვეობითაც არეგულირებს სიმპათიკური და პარასიმპათიკური ნერვული სისტემის აქტივობას. სტრესის პირობებში, სიმპათიკური სიტემის გააქტივირების შედეგად, ერთი მხრივ, სტიმულირდება თიკმელზედა ჯირკვლის ტვინოვანი შრიდან შედარებით დიდი რაოდენობით ეპინეფრინისა და შედარებით მცირე, თუმცა საკმარისი რაოდენობით ნორეპინეფრინის გამოყოფა, პარალელურად ასევე სტიმულირდება სიმპათიკური ნერვული დაბოლოებიდან ნორეპინეფრინის გამოყოფაც. ასეთი კატექოლამინების მოქმედებით ადგილი აქვს სხვადასხვა, პერიფერიულ და ცენტრალურ სამიზნეებზე ექსპრესირებული $\alpha_{(1–2)}$ და $\beta_{(1–3)}$ რეცეპტორების აქტივაციას, რაც საფუძვლად უდევს ისეთი პროცესების რეგულაციას, როგორებიცაა : გულის სისტოლური მოცულობის ზრდა, ტვინის მიმართულებით მიმავალი სისხლის ნაკადების ინტენსიფიცირება, კუნთური ტონუსის ზრდა „იჩხუბე ან იფრინე“ რეაქციის გასახორციელებლად და ა.შ.

მეორე მხრივ, აღსანიშნავი არის პარავენტრიკულური ბირთვის პარვოცელულარული ნაწილი, რომელიც პროექციებს აგზავნის რა ჰიპოთალამუსის შუამდებარე ბორცვთან, საჭიროებისამებრ იგი სტიმულირებს კორტიკოტროპინ რილიზინგ-ჰორმონის (CRH) გამოყოფას, რასაც მოსდევს ჰიპოთალამო-ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის ღერძის აქტივაცია, რომლის

ფარგლებშიც ჯერ ჰიპოფიზში სტიმულირდება ადრენოკორტიკოტროპული ჰორმონის (ACTH) გამოყოფა, შემდგომ კი დაიწყებს რა ეს უკანასკნელი ცირკულაციას, იგი დაუკავშირდება თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის ბაგირაკოვანი ზონის უჯრედებზე ექსპრესირებულ მელანოკორტინის რეცეპტორს (MC-2), საბოლოოდ განაპირობებს გლუკოკორტიკოიდების სინთეზისა და გამოყოფის ინიცირებას. სხვადასხვა ქსოვილში, მსგავსი მექანიზმით, ანუ გლუკოკორტიკოიდებისა და მინერალოკორტიკოიდების წარმოქმნითა და მათი რეცეპტორების გააქტივებით (GR და MR), ასევე ჰიპოთალამო-ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის ღერძისათვის დამახასიათებელი უარყოფითი უკუკავშირის მექანიზმის მეშვეობით, ბიოლოგიური სისტემა მაქსიმალურად ებრძვის სტრესული პროცესების განვითარებას, რომლის ფარგლებში, ერთი მხრივ, იგი მიმართული არის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და ბალანსის ნორმალიზირებისკენ, მეორე მხრივ, ის საჭიროებისამებრ განაპირობებს ენერგიის დიდი მარაგების მობილიზაციას და უტილიზაციას, სტრეს-ფაქტორების მოქმედების ინტენსივობიდან გამომდინარე [41; 42; 43].

მიტოქონდრია წარმოადგენს რა უჯრედის ძირითად წყაროს ენერგეტიკული თვალსაზრისით, ცნობილია რომ სტრესის ფონზე, მიტოქონდრიებში მიმდინარე ენერგეტიკული პროცესები საკმაოდ სერიოზულ ალტერაციებს განიცდის, რომლის ფარგლებშიც ხშირად ითრგუნება ატფ-ის ადეკვატური რაოდენობით წარმოქმნის პროცესი, რასაც საფუძვლად უდევს სხვადსხვა ტიპის მეტაბოლური პროცესებისა და მათი ფუნქციური რგოლების შეფერხება. უფრო მეტიც, არსებობს თეორია იმის შესახებ რომ სტრესულ პირობებში, ოქსიდაციური სტრესის განვითარების ფონზე, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევასთან მჭიდროდ არის დაკავშირებული ბიოლოგიური სისტემის დაბერების პროცესიც, რასაც დაბერების მიტოქონდრიული თეორიის სახელით ვიცნობთ. ზოგიერთი მონაცემის თანახმად, მიტოქონდრიაში წარმოდგენილი, ლოკალური დნმ-ი (mtDNA) ასეთ დროს განიცდის სერიოზულ დაზიანებებს ჟანგბადისა და აზოტის რეაქტიული ფორმების (ROS და RNS) მოქმედებით, რაც უშუალოდ დნმ-ის დაზიანებასთან ერთად განაპირობებს : მიტოქონდრია სპეციფიური დნმ-პოლიმერაზას აქტივობის შემცირებას, მიტოქონდრიული დნმ-ის რეპარაციის დათრგუნვას, რის შედეგადაც ექსპრესირდება რა დაზიანებული და მუტანტური ტიპის მიტოქონდრიული ცილები, ამას მოსდევს უჯრედული მეტაბოლიზმის მნიშვნელოვანი კომპონენტების ფუნქციურ გამოთიშვ. როგორც წესი, პროცესი აპოპტოზის ჩამრთველი სასიგნალო გზების აქტივაციით სრულდება, რასაც მოსდევს უჯრედის პროგრამირებული კვდომა, რაც დაბერების მიტოქონდრიულ თეორიაში ცენტრალურ ადგილს იკავებს[41 ; 43].

1.4 ფლავონოიდები

ფლავონოიდები პოლიფენოლური ბუნების მქონე მეორეული მეტაბოლიტების საკმაოდ დიდი ჯგუფია, რომლებიც დიდი რაოდენობითაა წარმოდგენილი მცენარეებსა და ზოგიერთ სოკოში. ფლავონოიდებისათვის დამასახიათებელია ბენზო-გამა-პირონული სტრუქტურა, მათი წარმოქმნა კი ძირითადად ფენილპროპანოიდული მეტაბოლური გზის ფარგლებში ხორციელდება. დღესდღობით თანამედროვე სამეცნიერო ლიტერატურა გვთავაზობს არაერთ მონაცემს იმის შესახებ რომ მცენარეებში წარმოდგენილი მრავალი, ფენოლური ბუნების მქონე ნაერთი, მათ შორის ფლავონოდიები, საკმაოდ მნიშვნელოვანი ფარმაკოლოგიური თვისებებით ხასიათდებიან. ბუნებრივ პირობებში, მცენარეული ორგანიზმი ფლავონოიდებს გამოიმუშავებს როგორც ანტიმიკრობული აქტივობის მქონე ჰიდროქსილირებულ ფენოლებს, რომელთა ფუნქციური მოქმედების სპექტრი, მათ შორის ფარმაკოლოგიური, მეტწილად დამოკიდებული არის ნაერთის სტრუქტურაზე. ამავდროულად, ცნობილია ისიც რომ ფლავონოიდები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან როგორც ჰიდროქსილირების ხარისხით, ასევე სტრუქტურული კლასით, პოლიმერიზაციის მაჩვენებლითა და სხვადასხვა კონიუგატებისა და თანხმლები ნაერთების დაკავშირებით ბუნებრივ მდგომარეობაში. ფუნქციური თვალსაზრისით, ფლავონოიდების შემადგენლობაში უხვად წარმოდგენილი ჰიდროქსილის ჯგუფები, ერთი მხრივ, ახორციელებენ თავისუფალი რადიკალების დაკავშირებას და მათგან სისტემის გაწმენდას, მეორე მხრივ, ამავე ქიმიური ჯგუფების შემცველობის გამო, ფლავონოიდები ქელატურ აგენტებადაც გვევლინებიან, ახორციელებენ რა მრავალი მეტალის იონის შებოჭვას. ფლავონოიდების ქელატური თვისებები პოტენციურად კრუციალურია თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნასთან მიმართებაში, რის გამოც, ფლავონოიდების ფარმაკოლოგიური გამოყენება, პოტენციურად უნდა თრგუნავდეს პროოქსიდაციურ სტატუსს ბიოლოგიურ სისტემაში. არაერთი *in vitro* თუ *in vivo* კლევის ფარგლებში, დადასტურებულია რომ ფლავონოიდები, როგორც საკვები დანამატები, ახორციელებენ ანტიოქსიდანტური სისტემის შემადგენლობაში წარმოდგენილი ფერმენტების აქტივობის ზრდას. გარდა ამისა, არაერთგზის არის დადასტურებული ფლავონოდიების ანტიმიკრობული, მათ შორის ანტიფუნგალური, ანტიბაქტერიული და ანტივირუსული მოქმედება, ფლავონოიდების როლი დიდია სხვადასხვა დეგენერაციული დაავადებების მიმდინარეობისას ჩატარებულ თერაპიებში, მათ შორის : გულ-

სისხლძაღვოვანი დაავადებები, ნეიროდეგენერაციები, ასევე აღსანიშნავია დაავადებათა ონკოლოგიური ჯგუფი, დაბერებასთან ასოცირებული პროცესები და სხვა [44 ; 45; 46; 47].

რაც შეეხება ფლავონოიდების ნატიურ მოქმედებას მცენარეულ ორგანიზმში, ცნობილია რომ რომ ისინი მცენარეების მეორეული ანტიოქსიდანტური სისტემის შემადგენლობაშია წარმოდგენილი, რომლებიც აქტიურად იღებენ თავდაცვით პროცესებში მონაწილეობას სხვადასხვა ტიპის ბიოტური და აბიოტური ტიპის სტრესულ პროცესებთან მიმართებაში. ფლავონოიდებს განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით ვხვდებით მეზოფილის უჯრედების ბირთვში, ასევე ჟანგბადის აქტიური ფორმების (ROS) წარმოქმნის საიტებშიც. ნანახია, რომ ფლავონოიდები არაერთი მცენარეული ზრდის ფაქტორის (ზრდის რეგულატორის) ექსპრესიის პატერნებს არეგულირებს, რომელთა შორის განსაკუთრებით აღსანიშნავია აუქსინი. თანამედროვე ბიოტექნოლოგიური მიდგომები დღესდღეობით აქტიურად მოიცავს მცენარეებსა და სპეციფიურ სოკოებში, კონკრეტული ფლავონოიდების მაკოდირებელი გენების რაოდენობის ხელოვნურ ზრდას, რაც ფლავონოიდების კომერციული მიზნებით გამოყენების საკმაოდ კარგ წყაროს წარმოადგენს [46; 48; 49].

ცნობილია, რომ დღესდღეობით განარჩევენ ფლავონოიდების 4000-მდე წარმომადგენელს. ქიმიური თვალსაზრისით, ყოველი ფლავონოიდის სტრუქტურის საფუძველს წარმოადგენს 15 ნახშირბადის ატომისაგან შემდგარი, ბენზენის ორი რგოლისგან წარმოდგენილი ჩონჩხი, რომლებიც ერთმანეთთან ჰეტეროციკლური პირანის რგოლითაა დაკავშირებული. ფლავონოიდები კლასიფიცირდება სხვადსხვა ჯგუფებად, მათ შორისაა :

- ფლავონების ჯგუფი - ფლავონი, ლუტეოლინი, აპიგენინი და ა.შ.
- ფლავონოლების ჯგუფი - კვარცეტინი, ფისეტინი, მირიცეტინი და ა.შ.
- ფლავანონების ჯგუფი - ფლავანონი, ჰესპერიდინი, ნარინჯინი და ა.შ.

ფლავონოიდები ხშირად აგლიკონების, გლიკოზიდებისა და მეთილირებული დერივატების სახითაა წარმოდგენილი. სტრუქტურული თვალსაზრისით, ფლავონოიდები ასევე შეიძლება იყოს როგორც ალფა-პირონები, ასევე დიჰიდროდერივატები. ფლავონოიდების კლასიფიკაცია ასევე ხორციელდება მათ შემადგენლობაში ბენზენოიდური ჯგუფის პოზიციით. თუკი, ბენზენოიდური ჯგუფი წარმოდგენილია მე-2 პოზიციაში, მაშინ ასეთ ნაერთებს ფლავონოიდები ეწოდება, ხოლო თუკი ეს ჯგუფი მ-3 პოზიციაში გვხვდება, მაშინ მათ იზოფლავონოიდები ეწოდებათ. ამავდროულად, ფლავონოიდების ჰიდროქსილირება

განსაკუთრებით ხშირად ხორციელდება მე-2, მე-3, მე-5 და მე-7 პოზიციებში. ფლავონოიდების ალკოჰოლის ჯგუფი ხშირად სხვადასხვა მცენარეულ ორგანიზმში მეთილის ეთერებისა და აცეტილის ესთერების ფორმირებაში იღებს მონაწილეობას [47; 50; 51; 52].

ორგანიზმის მიერ ფლავონოიდების შეთვისება მეტწილად მათ ფიზიკურ და ქიმიურ მახასიათებლებზე არის დამოკიდებული, რომელთა შორის აღსანიშნავია : მოლეკულური მასა, კონფიგურაცია, ლიპოფილობა, ხსნადობა და pKa. ფლავონოიდების შეწოვა უმეტეს შემთხვევაში წვრილ ნაწლავში ხორციელდება, თუმცა ზოგიერთი მათგანი მსხვილ ნაწლავში შეითვისება ორგანიზმის მიერ. ზემოთხსენებულის გარდა, ფლავონოიდების შეთვისების ხარისხი ასევე დამოკიდებული არის იმაზე, თუ რა ტიპის ფლავონოიდთან გვაქვს საქმე, კერძოდ გლიკოზიდთან თუ აგლიკონთან. ცნობილია, რომ ფლავონოიდების უდიდესი ნაწილი, გამონაკლისის სახით კი შეგვიძლია განვიხილოთ ეპიკატექინების ქვეჯგუფი, მცენარეულ უჯრედებში კონიუგირებულნი არიან შაქრებთან ბეტა-გლიკოზიდების სახით. შესაბამისად, წვრილ ნაწლავშიაგლიკანების შეთვისება მარტივად ხორციელდება, მაშინ როცა გლიკოზიდების სახით წარმოდგენილი ფლავონოიდები, ჯერ აგლიკანებად კონვერტირდებიან, შემდეგ კი შეითვისებიან ორგანიზმის მიერ [53 ; 54].

გლიკოზიდური ბუნების მქონე, ჰიდროფილური ფლავონოიდების ტრანსპორტი წვრილ ნაწლავში, მაგ : კვარცეტინი, ხორციელდება Na^+-დამოკიდებული გლუკოზის ტრანსპორტერის (SGLT1) მეშვეობით. არსებობს მექანიზმი, რომლის ფარგლებშიც ზოგიერთი ფლავონოიდი განიცდის ჰიდროლიზს ფერმენტ ლაქტაზ-ფლორიზინ ჰიდროლაზას (LPH) მეშვეობით, რომელიც ბუნებით ბეტა-გლუკოზიდაზაა. ენზიმი წვრილი ნაწლავის ამომფენი ეპითელიოციტების პლაზმური მემბრანის გარე ნაწილთან არიან ასოცირებულნი. ლაქტაზ ფლორიზინ ჰიდროლაზა არის მეტ-ნაკლებად სუბსტრატ სპეციფიური, რომელიც ვარიაბელური მაჩვენებელია და ფლავონოიდებთან ასოცირებული გლიკოზიდების ბუნებაზეა დამოკიდებული, იქნება ეს : გლუკოზიდები, გალაქტოზიდები, არაბინოზიდები, ქსილოზიდები თუ რამნოზიდები. ისეთი ფლავონოიდები, რომლებიც შეიცავენ LPH-თვის არასპეციფიურ და არარელევანტურ გლიკოზიდებს, ტრანსპორტირდებიან მსხვილ ნაწლავში, სადაც ნაწლავის მიკროფლორის წარმომადგენელი ბაქტერიები ახორციელებენ როგორც გლიკოზიდების, ასევე თავად ფლავონოიდებისა და აგლიკონური ჯგუფების ჰიდროლიზს. იქიდან გამომდინარე, რომ მსხვილ ნაწლავში მსგავსი ნაერთების შეწოვა გაცილებით დაბალი ინტენსივობით ხორციელდება, მიიჩნევა რომ ამ ტიპის ფლავონოიდები ორგანიზმში გაცილებით მცირე რაოდენობით ხვდება [47].

აბსორბციის შემდგომ, ფლავონოიდები, ერთი მხრივ, კონიუგირდებიან მეთილირების, სულფიდირების ან გლუკურონიდაციის გზით, მეორე მხრივ, ადგილი აქვს მათ ჩართვას სპეციფიურ მეტაბოლურ გზებში, რის შედეგადაც შედარებით მცირე მოლეკულური მასის მქონე, ფენოლური ნაერთების მიღება ხორციელდება. ღვიძლში მიმდინარე კონიუგირებისა და მეტაბოლური კონვერტაციის პროცესებიდან გამომდიანრე, შარდსა და პლაზმაში, არცერთი ტიპის ფლავონოიდი გვხვდება ნატიური სახით ერთადერთი გამონაკლისის გარდა, რომელსაც ეპიკატექინი წარმოადგენს. ასევე ცნობილია, რომ ფლავონოიდების შეთვისების ხარისხი დამოკიდებულია იმაზე, თუ რომელ საკვებ პროდუქტშია იგი წარმოდგენილი, მაგ : ნიორში წარმოდგენილი კვარცეტინი გაცილებით მაღალი ხარისხით შეითვისება ორგანიზმის მიერ, ვიდრე იგივე კვარცეტინი წარმოდგენილი ჩაისა ან ვაშლში. აღსანიშნავია, რომ ფლავონოიდებს შორის ყველაზე მაღალი ბიოშეთვისებადობის მაჩვენებლით გამოირჩევიან იზოფლავონოიდები [48].

1.5 სტრესის პრევენცია ფლავონოიდებით

როგორც აღინიშნა, ფლავონოიდებს საკმაოდ მრავალფეროვანი თვისებები გააჩნიათ ბიოლოგიურ სისტემებში. დაწყებული ანტიოქსიდანტური და ანტი-ინფლამაციური თვისებებით, ფლავონოიდები ასევე ხასიათდებიან ანტიმიკრობული, ანტიკანცეროგენული, ჰეპატოპროტექტორული, ნეირო და კარდიოპროტექტორული თვისებებითა და ა.შ. სწორედ აქედან გამომდინარე, არ არის გასაკვირი, რომ ფლავონოიდების როლი სტრესის პრევენციასთან მიმართებაში პოტენციურად საკმაოდ იმედისმომცემი უნდა იყოს.

ფლავონოიდები ხასიათდებიან რა მრავალფეროვანი ბიოქიმიური მახასიათებლებითა თუ თვისებებით, ყველაზე თვალსაჩინო მათი ანტიოქსიდანტური თვისებებია. ფლავონოიდების ანტიოქსიდანტური თვისებები მეტწილად დამოკიდებული არის მათი სივრცითი კონფიგურაციითა და კონფორმაციით, ფუნქციური ჯგუფების გადანაწილებით და ჰიდროქსილის ჯგუფების რაოდენობით, რომელთა მეშვეობითაც ფლავონოიდებს, ერთი მხრივ, შეუძლიათ თავისუფალი რადიკალების შებოჭვა, მეორე მხრივ, ისინი მეტალთა იონების მაქელატირებელ აგენტებად გვევლინებიან. ასეთ შემთხვევაში, განსაკუთრებით აღსანიშნავი არის ისეთი ფლავონოიდები, რომლებიც ბეტა-რგოლის ტიპის კონფიგურაციით ხასიათდებიან, ასეთ ფლავონოიდურ ნაერთებში საკამოდ მაღალია ჰიდროქსილის ჯგუფების შემცველობა და

როგორც წესი, ისინი საუკეთესო ანტიოქსიდანტებად ითვლებიან, ახდენენ რა ROS-სა და RNS-ს ყველაზე ეფექტურ ელიმინაციას, რაც განპირობებულია იმით, რომ ასეთი ფლავონოიდური ნაერთები საკმაოდ იოლად გადასცემენ ერთ წყალბადის პროტონსა და ელექტრონს ჰიდროქსილის, პეროქსილის ან პეროქსინიტრიტულ რადიკალებს [45 ; 46; 55].

ფლავონოიდების ანტიოქსიდანტური ფუნქციონირება 2 ძირითად უნარზე არის დამოკიდებული. ერთი მხრივ, მათ შეუძლიათ ROS-ის წარმოქმნის დათრგუნვა მათ სინთეზში მონაწილე ენზიმების ინჰიბირებით, მეორე მხრივ, კი ქელატური ბუნებიდან გამომდინარე ისეთი მეტალთა იონების შებოჭვა, რომლებიც თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნაში იღებენ მონაწილეობას. ზოგიერთი ფლავონოიდი მხოლოდ ერთი მექანიზმით მოქმედებს, მაშინ როცა შედარებით ძლიერი ანტიოქსიდანტური თვისებების მქონე ფლავონოიდები, როგორც წესი, ორივე თვისებით ხასიათდება. იმ ენზიმებს შორის, რომლებიც ROS-ის ფორმირებაში იღებენ მონაწილეობას, აღსანიშნავია : მიკროსომული მონოოქსიგენაზა, გლუტათიონ-S-ტრანსფერაზა, მიტოქონდრიული სუქცინოქსიდაზა და NADH ოქსიდაზა.

ცნობილია, რომ ოქსიდაციური სტრესის ერთ-ერთ თანხმლებ პროცესს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვა წარმოადგენს. ფლავონოიდებს გააჩნიათ ამ პროცესის შესუსტების უნარი, რასაც ისინი რამდენიმე გზით ახორციელებენ. მეტალების თავისუფალი იონები განაპირობებენ ROS-ის ფორმირებას წყალბადის ზეჟანგის აღდგენით, რასაც მოჰყვება ძალიან რეაქტიული ჰიდროქსილის რაკიდალის წარმოქმნა. შედარებით დაბალია რა ფლავონოიდების (Fl-OH) ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალი, ფლავონოიდებს თერმოდინამიკურად შეუძლიათ ისეთი დამჟანგავი თავისუფალი რადიკალების აღდგენა, როგორებიცაა : სუპეროქსიდი, პეროქსილი, ალკოქსილი და ჰიდროქსილის რადიკალები, რასაც ფლავონოიდები წყალბადის ერთი ატომის დონაციით ახორციელებენ. გარდა ამისა, ფლავონიდების მაქელატირებელი უნარი, ამ შემთხვევაში განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია. მაგალითისთვის, ცნობილია, რომ კვარცეტინი არის რკინის მაქელატირებელი აგენტი, ასევე გააჩნია რკინის მასტაბილიზებელი უნარი. მაგალითისთვის, ცნობილია რომ ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ერთ-ერთ საუკეთესო დამთრგუნველს ფლავონოიდებს შორის, წარმოადგენს 3’, 4’ - კატექოლი, რომელიც ერთნაირი წარმატებით ბოჭავს პეროქსილს, სუპეროქსიდსა და პეროქსინიტრიტულ რადიკალებს. ანალოგიური თვისებებით ხასიათდება ეპიკატექინი და რუტინი [48 ; 56 ; 57; 58].

ფლავონოიდების შემადგენლობაში წარმოდგენილი შაქრების სტრუქტურა, შემცველობის ფაქტი, რაოდენობა და პოზიცია, განსაზღვრავს ფლავონოიდის ანტიოქსიდანტურ თვისებებს.

თუმცა, თავისი არსით, აგლიკონები გაცილებით ძლიერი ანტიოქსიდანტები არიან, ვიდრე მათი თანხმლები გლიკოზიდები [58].

II. კვლევის ობიექტი და მეთოდები

II.1 კვლევის ობიექტი

ექსპერიმენტები ტარდებოდა მამრობითი სქესის, თეთრ, ლაბორატორიულ ვირთაგვებზე, რომლებიც დაყოფილი იყვნენ 4 ჯგუფად (თითოეულ ჯგუფში 10 ვირთაგვა). I ჯგუფს შეადგენდა საკონტროლო ვირთაგვები (G1 ჯგუფი) რომლებიც მოთავსებულნი იყვნენ ერთად, საერთო გალიაში, ჩვეულებრივ პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 10.00/14.00სთ.). II ჯგუფს წარმოადგენდა ასევე 10 ვირთაგვა, რომლებიც სოციალური იზოლაციის მიზნით განთავსებული იყვნენ ინდივიდუალურ გალიებში, სიბნელის პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 23.5სთ/0.5სთ.) (G2 ჯგუფი). ცხოველები იმყოფებოდნენ სრულ მხედველობით იზოლაციაში. G3 ჯგუფის ინდივიდები, ასევე იმყოფებოდნენ სოციალურ იზოლაციასა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, თუმცა სტრესის პარალელურად, მათ ყოველდღიურად ინტრაპერიტონიალურად მიეწოდებოდათ 7.5 მგ/კგ ფლავონოიდების სუმარული ექსტრაქტი (GOF) (III ჯგუფი). მე-4 ჯგუფის (G4 ჯგუფი) 10 წარმომადგენელი ვირთაგვა, იმყოფებოდა მესამე ჯგუფის ანალოგიურ პირობებში, იმ განსხვავებით რომ მათ ყოველდღიურად და ინტერპერიტონიალურად მიეწოდებოდათ 7.5 მგ/კგ კომერციული ფლავონოიდი ნობილეტინი.

არც ერთი ჯგუფისათვის ყნოსვა და სმენა შეზღუდული არ იყო. ცხოველებს საკვები და წყალი ეძლეოდათ შეუზღუდავად. ასეთ პირობებში ვირთაგვები იმყოფებოდნენ 30 დღის განმავლობაში, რის შემდგომაც მოხდა ოთხივე ჯგუფის ვირთაგვების დაძინება ქლოროფორმით და მათი დეკაპიტაცია სისხლისა და გულის მიღებისათვის.

II.2 ფლავონოიდური ექსტრაქტის მიღება

სეიკე ნაველის ჯიშის ფორთოხლის კანიდან ფლავონოიდების ექსტრაქტის მისაღებად გამოვიყენეთ ზაპრომეტოვის მეთოდი, რომელიც ემყარება წყლიანი ექსტრაქტიდან უხსნადი მარილის გამოლექვასა და შემდგომ ნალექის კვლავ ხსნად ფორმაში გადაყვანას. რის შემდეგაც ადგილი აქვს ექსტრაქტის ფრაქციონირებას გამხსნელთა შეურეველ ფაზებს შორის

განაწილებით. ჩვენ მოვახდინეთ ამ მეთოდის მოდიფიცირება ბენზოლით გამოწვლილვის ეტაპის დამატებით, რომელიც ითვალისწინებს ხსნარიდან ლიპოფილური ნაერთების მოშორებას.

საწყის ეტაპზე მოვახდინეთ ფორთოხლის კანის გამოცალკევება და მისი მაქსიმალურად ჰომოგენური სტრუქტურის სახით დაქუცმაცება, რის შემდგომაც მშრალი მასა მოვათავსეთ ფილტრის ქაღალდის პაკეტში. გამხსნელად გამოვიყენეთ სპირტწყალ ხსნარი და მოვახდინეთ მასის გამოწვილვა სოქსლეტის აპარატის მეშვეობით.

მომდევნო ეტაპზე მოვახდინეთ ბენზოლით გამოწვლილვა სამჯერადად 1/1-ზე, რათა ფორთოხლის კანის ექსტრაქტიდან მოგვეცილებინა ლიპოფილური ნაერთები. სწორედ ამ ეტაპზე მოხდა ზაპრომეტოვის მეთოდის მოდიფიცირება. ფრაქციის გამოყოფის შემდეგ მოვახდინეთ ბენზოლიანი ხსნარის ვაკუუმ გადადენა, რათა სრულად აგვეორთქლებინა ნარჩენი ბენზოლი და სპირტი, ანუ მოვახდინეთ დეალკოჰოლიზაცია. ამ ეტაპზე სპირტში გახსნილი ფლავონოიდები მთლიანად გადავიდნენ წყალში.

შემდგომ ეტაპზე მოვადინეთ ფლავონოიდების ექსტაქცია, ამჯერად ეთილაცეტატით. შეფარდება იყო ისევ 1/1-ზე, რაც გამეორდა სამჯერ. ცდის ამ ნაწილში ფლავონოიდები წყლიანი ფაზიდან გადავიდა ეთილაცეტატში.

ექსტრაქციის შემდეგ საჭირო იყო წყლის მოცილება, რაც მოვახდინეთ Na_2SO^4-ით. თავდაპირველად, მარილი ჩავყარეთ ჩვენს მიერ მიღებულ ხსნარში და შევანჯღრიეთ. შემდეგ ძაბრზე მოვათავასეთ ქაღალდის ფილტრი და ჩავყარეთ Na_2SO_4, რის შემდგომაცნელ-ნელა გავფილტრეთ ეთილაცეტატში გახსნილი ფლავონოიდების ხსნარი.

მომდევნო ეტაპზე მოვახდინეთ ეთილაცეტატის გადადენა და დაკონცენტრირება. ეთილაცეტატის გადადენა იგივე პირობებში მოვახდინეთ, როგორშიც ბენზოლისა, თუმცა, ამ შემთხვევაში ავაორთქლეთ დიდი რაოდენობით, რათა დაგვეკონცენტრირებინა ფლავონოიდები და გაგვეადვილებინა მათი გამოშრობა ანაეროსტატში.

ეთილაცეტატის გადადენის შემდგომ კონცენტრატი გადავიტანეთ ფაიფურის ფინჯანში და მოვათავსეთ ანაეროსტატში, სადაც შევქმენით ვაკუუმი -60 კპა, ტემპერატურა გავზარდეთ 75°C-მდე. კონცენტრატი შრებოდა დაახლოებით 3-4 დღე. შრობის შემდეგ მოვახდინეთ ფლავონოიდების მიღება ფხვნილის სახით. ის მასა კი, რომელიც ვერ შორდებოდა ჭურჭელს აფხეკვით, გავხსენით ეთილის სპირტით, ანუ მივიღეთ ფლავონოიდების სპირტხსნარი.

2.3 ქოლესტერინის რაოდენობის განსაზღვრა

ქოლესტერინის განსაზღვრას ვახდენდით ექსპერიმენტული ცხოველების სისხლში (კომერციულად ხელმისაწვდომი კიტები Antibodies-online GmbH-გან, გერმანია). განსაზღვრის მეთოდიკა შეესაბამება პროტოკოლით განსაზღვრულ წესსა და თანამიმდევრობას.

I. რეაგენტის მომზადება და სტაბილურობა

რეაგენტი და სტანდარტი მზა მდგომარეობაშია. რეაგენტები სტაბილურია ყუთზე მითითებულ ვადებში 2-8°C-ზე, ხოლო 15-25°C-ზე რეაგენტები სტაბილურია 2 კვირა,

ნიმუში : სისხლის პლაზმა

ცდის პირობები:

გაზომვა (ტალღის სიგრძე - λ - 500 ნმ / HG 546 ნმ

ოპტიკური გზა : 1 სმ

ტემპერატურა: 20°C -25 °C ან 37 ^{0}C

ცდის მიმდინარეობა:

კიუვეტის N	სამუშაო რეაგენტი	ნიმუში	სტანდარტი
1. ნიმუში	-	10 მკლ	-
2. სტანდარტი	-	-	10 მკლ
3. დამატებული რეაგენტის რაოდენობა	1000 მკლ	1000მკლ	1000მკლ

კიუვეტების ინკუბაცია წარმოებს 10 წთ 20-25°C-ზე ან 5 წთ 37 °C-ზე. ნიმუშისა და სტანდარტული ხსნარის შეფერვის ინტენსივობა იზომება სამუშაო რეაგენტის მიმართ 60 წთ-ის განმავლობაში λ- 546 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

ქოლესტერინის კონცენტრაციის განსაზღვრა:

ტალღის სიგრძე	220მგ/დლ	5.7მმოლი/ლ
Hg 546ნმ	840xΔA	21.7xΔA

500ნმ	553xΔA	14,3XΔA

სტანდარტი კატ.10015

C = 5.17 x ΔAსინჯი / ΔAსტანდარტი(მმოლი/ლ) ან

C = 200 x ΔAსინჯი / ΔAსტანდარტი(მგ/დლ)

ΔA - ექსტინციის სიდიდე

2.4 ტრიგლიცერიდების რაოდენობის განსაზღვრა

ქოლესტერინის განსაზღვრას ვახდენდით ექსპერიმენტული ცხოველების სისხლში, რისთვისაც გამოყენებული იყო კომერციულად ხელმისაწვდომი კიტები Antibodies-online GmbH-გან, გერმანია. განსაზღვრის მეთოდიკა შეესაბამება პროტოკოლით განსაზღვრულ წესსა და თანამიმდევრობას.

რეაგენტის მომზადება და სტაბილურობა

რეაგენტი და სტანდარტული ხსნარი მზა მდგომარეობაშია. რეაგენტები სტაბილურია ყუთზე მითითებულ ვადებში 2-8 ^{0}C-ზე. 15-25 ^{0}C-ზე რეაგენტები სტაბილურია 4 კვირის განმავლობაში.

ცდის პირობები:

გაზომვა - ტალღის სიგრძე - λ - 500 ნმ / HG 546 ნმ

ოპტიკური გზა : 1 სმ

ტემპერატურა: 20^{0}C -25^{0}C ან 37^{0}C

გაზომვები:სამუშაო რეაგენტისმიმართ

ცდის მიმდინარეობა:

კიუვეტის N	სამუშაო რეაგენტი	ნიმუში	სტანდარტი

1. ნიმუში	-	10 მკლ	-
2. სტანდარტი	-	-	10 მკლ
დამატებული რეაგენტის რაოდენობა	1000 მკლ	1000მკლ	1000მკლ

ინკუბაცია 10 წთ 20-25^{0}C-ზე ან 5 წთ 37 ^{0}C. ნიმუშისა და სტანდარტის შეფერილობის ინტენსივობა იზომება სამუშაო რეაგენტის მიმართ 60 წთ-ის განმავლობაში 546 ნმ-ზე.

C=200 x ΔAსინჯი/ΔAსტანდარტი(მგ/დლ) ან C=2.28 xΔAსინჯი/ΔAსტანდარტი(მმოლი/ლ).

ΔA - ექსტინციის სიდიდე

2.5 მაღალი და დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების რაოდენობის განსაზღვრა

სისხლში მაღალი და დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების რაოდენობას სისხლის პლაზმაში ვსაზღვრავდით კომერციულად ხელმისაწვდომი კიტებს (Antibodies-online GmbH, გერმანია) მიხედვით. ცდა მიმდინარეობდა მოწოდებული კიტის პროტოკოლის მიხედვით.

1.რეაგენტის მომზადება

ა)დამლექავი მაკრო - Assay (PRECa)

გამოიყენება სუფთა, განუზავებელი რეაგენტი (PRECa)

ბ) დამლექავი ნახევრად მიკრო - [PRECb]

რეაგენტის ჭურჭლის შიგთავსი იხსნებოდა 20 მლ დისტილირებულ წყალში ან შეფარდებით 4:1.

2. სტანდარტი - მზა მდგომარეობაშია. გამოსათვლელ ფორმულაში გათვალისწინებულია განზავების თანაფარდობა.

ხსნარების სტაბილურობა - გახსნის შემდეგ HDL რეაგენტი სტაბილურია ყუთზე მითითებული შენახვის ვადის განმავლობაში 20-25^{0}C -ზე.

ნიმუში : სისხლის პლაზმა.

3. ანალიზის მიმდინარეობა:

ა) სისხლის პლაზმის ცილების დალექვა

ისხმება პირდაპირ ცენტრიფუგის სინჯარებში	მაკრო მეთოდი	ნახევრად მიკრო მეთოდი
ნიმუში	500 მკლ	200 მკლ
დამლექი(განუზავებელი) (PRECa)	1000 მკლ	
დამლექი(განზავებული) (PRECb)		500 მკლ

ხსნარს ვურევთ კარგად, ვაინკუბირებთ 10 წთ ოთახის ტემპერატურაზე, შემდეგ ვაცენტრიფუგირებთ 2 წთ 10 000g-ზე ან 10 წთ 4000g-ზე. ცენტრიფუგირების შემდეგ სუფთა სუპერნატანტს ვიღებთ და ვსაზღვრავთ ქოლესტერინის კონცენტრაციას ქოლესტერინის რეაგენტის გამოყენებით.

ბ) ქოლესტერინის აღრიცხვა

კიუვეტში ჩასხმული ხსნარები	სამუშაო რეაგენტი	სტანდარტი	ნიმუში
დისტილირებული	100 მკლ	-	-

წყალი			
სტანდარტი	-	100 მკლ	-
HDL სუპერნატანტი	-	-	100 მკლ
რეაგენტი	1000 მკლ	1000 მკლ	1000 მკლ

ნარევს ვაინკუბირებთ 5 წთ 37^{0}C-ზე ან 10 წთ 20-25^{0}C -ზე. ვზომავთ (ΔAსინჯი) და სტანდარტის (ΔA სტანდ.) გაზომვა წარმოებს მნიშვნელობებს სამუშაო რეაგენტის მიმართ 60 წუთის განმავლობაში λ= 546 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

4. HDL- ქოლესტერინის კონცენტრაციის განსაზღვრა სტანდარტით

მაკრო მეთოდი:

C=150x ΔAსინჯი/ΔAსტანდარტი(მგ/დლ) ან C=3.87xΔAსინჯი/ΔAსტანდარტი(მმოლი/ლ)

ნახევრად მიკრო მეთოდი :

C=175x ΔAსინჯი/ΔAსტანდარტი(მგ/დლ) ან C=4.52xΔAსინჯი/ΔAსტანდარტი(მმოლი/ლ)

5.LDL-ქოლესტერინის კონცენტრაციის განსაზღვრა

LDL ქოლესტერინის კონცენტრაცია (LDL-C) გამოითვლება საერთო ქოლესტერინის(TC), მაღალი ქოლესტერინის(HDL-C) და ტრიგლიცერიდების(TG) კონცენტრაციების საშუალებით.

LDL-C=TC-HDL-C ×TG/5(მგ/დლ) ან LDL-C=TC-HDL-C ×TG/2.2(მმოლი/ლ)

2.6 მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობის განსაზღვრა

მაღალ ტემპერატურასა და მჟავე არეში მალონის დიალდეჰიდი (მდა) რეაგირებს 2 თიობარბიტურის მჟავასთან და წარმოქმნის შეფერილ ტრიმეთინურ კომპლექსს, რომელსაც გააჩნია მაქსიმალური შთანთქმის სპექტრი 532ნმ ტალღის სიგრძეზე.

საჭირო რეაქტივები :

- 10%-იანი წყალზე დამზადებული ტრიქლორმარმჟავა (ТХУ);
- 0,8%-იანი 2-თიობარბიტურის მჟავა (2-თბმ) დისტილირებულ წყალზე. ხსნარი მზადდება ადუღებული წყლიან აბაზანაში ცდის წინ.

ცდის მსვლელობა - 2.5მლ სისხლს ემატება 2.5მლ ТХУ, კარგად ინჯღრევა და ცენტრიფუგირდება 3000ბრ./წთ 15 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდგომაც ყოვნდება სიცივეში 15 წთ. 3მლ ზედა ხსნარი ცენტრიფუგირდება, ემატება 1.5მლ 2-თბმ და კარგად ინჯღრევა. ამის შემდგომ სინჯარა თავსდება ზუსტად 15 წთ მდუღარე წყლიან აბაზანაში. რეაქციის მსვლელობისას წარმოიქმნება ვარდისფერი შეფერილობა. აბაზანიდან ამოღების შემდგომ სინჯარები თავსდება ცივი წყალში და კვლავ ცენტრიფუგირდება. ცდის პარალელურად მზადდება საკონკროლო სინჯი, სადაც სისხლის პლაზმის მაგივრად შეტანილია 2.5მლ დისტილირებული წყალი. შეფერილობა იზომება 532ნმ ტალღის სიგრძეზე საკონტროლოსინჯის მიმართ.

მალონის დიალდეჰიდის შემცველობა განისაზღვრება ფორმულით:

$$C = \frac{E \times 10^6 \times 3}{1{,}56 \times 10^5},$$

სადაც C — მალონის დიალდეჰიდის კონცენტრაციაა მკმოლი/ლ; E — სინჯის ოპტიკური სიმკვრივე; 106 — გადაანგარიშების კოეფიციენტი (მკმოლი/ლ); 3 — განზავების ფაქტორი; 1,56 • 10^5 —მოლარული ექსტინციის ფაქტორი მალონის დიალდეჰიდისა 2-თბმ-თან.

2.7 Ca^{2+}-ის იონების 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. მიღებული სიდიდე პირდაპირპროპორციულია კალციუმის იონების შემცველობისა.

2.8 აზოტის მონოოქსიდის რაოდენობის განსაზღვრა

აზოტის მონოოქსიდის რაოდენობის განსაზღვირსათვის, საკვლევი ნიმუშის ჰომოგენატის ყოველ 100 µl ემატებოდა თანაბარი რაოდენობის 0.3 M-ის NaOH. მიღებულ ნარევს ვანჯღრევდი თოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ-ისგანმავლობაში. ნარევს ემატებოდა 100 µl 5%-იანი ZnSO4 და კვლავ ვანჯღრევდით 5 წთ-ისგანმავლობაში. 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-სა და 0.1%-იან სულფამიდამიდს. საკონტროლო სინჯარა შეიცავდა ყველა რეაქტივს, თუმცა ჰომოგენატის მაგივრად სარეაქციო არეში შეტანილი იყო 100 µl დისტილირებული წყალი. მიღებული ნარევი ყოვნდებოდა 30წთ 37°C-ზე და შეფერილი ხსნარი იზომებოდა 540 ნმ ტალღის სიგრძეზე სპექტროფოტომეტრულად (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland). მიღებული მონაცემებიითვლებოდა $NaNO_2$-ის სტანდარტულ მრუდზე.

2.9 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:

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

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

- E_0 - შთანთმის სპეტრის მაჩვენებელია ცდის საწყის ეტაპზე,
- E_{20} -შთანთმის სპეტრის მაჩვენებელია 20 წუთიანი ინკუბაციია შემდგომ.

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

2.10 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 მლსაკვლევმასალას (100 მგქსოვილი/1 მლტრის-HCl (0.05 M), pH=7.8) ვუმატებდით 2 მლწყალბადისზეჟანგს (0.03%), ხოლო ბრმაცდისთვის 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

A ბრმა ცდა - შუქშთანთქმის სიდიდე ბრმა ცდისთვის

A ცდა - 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).

2.11 სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვირსთვის, თავდაპირველად ვახდენდით გულის კუნთის უჯრედებიდან მიღებული მიტოქონდრიული ფრაქციის სუსპენზირებას 0.5 მლ ბუფერში, რომელიც შეიცავს 50 მმოლ Tris-HCl-ს (pH 7.4). შემდგომ ეტაპზე ვახდენდით მიტოქონდრიების ინკუბირებას 30 წუთის განმავლობაში 37 ^{0}C გრადუსზე 2%-იან MTT-ში (3-(4,5-დიმეთილთიაზოლ-2)-2,5-დიფენილ ტეტრაზოლიუმ ბრომიდი), რომელიც გახსნილი იყო 0.05 მოლი Tris-ის, 0.5 მმოლ $MgCl_2$-ის, 2.5 მმოლ $CoCl_2$ and 0.25 მოლი დისოდიუმის სუქცინატის შემცველ ხსნარში (Sigma–Aldrich).

შემდგომ ეტაპზე მიტოქონდრიებს ვათავსებდით 150 მკლ, 6.35%-იან 0.1N NaOH-ისა და დიმეთილ სულფოქსიდის შემცველ ხსნარში, ფორმაზანის შეღებილი პროდუქტი კი იზომებოდა მიკროპლანშეტურ რიდერზე, ტალღის სიგრძე 560 ნმ. ერთი ერთეული (U) განისაზღვრა როგორც ენზიმის ის საჭირო რაოდენობა, რომელიც აუცილებელია რომ წარმოიქმნეს ერთი მიკრო/მოლი ფორმაზანი 1 წუთში. (∈560=17მმოლ–1 cm–1) [59].

2.12 კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტი კრეატინკინაზა განაპირობებს ფოსფატის ჯგუფის გადაცემას ფორფოკრეატინიდან კრეატინზე. მეთოდის ფარგლებში განისაზღვრა თავისუფალი ფოსფორის ის რაოდენობა, რომელიც გამოთავისუფლდა ატფ-ის ჰიდროლიზის შედეგად მიტოქონდრიაში. მეთოდი დამყარებული არის ფოსფოვანადიუმ-მოლიბდატის კომპლექსის წარმოქმნაზე, რომლის რაოდენობრივი განსაზღვრა ხორციელდება სპექტროფოტომეტრული ანალიზის მეშვეობით.

სარეაქციო ხსნარი მოიცავდა საკვლევი ნიმუშის 100 მკლ-ს და 0.5 მლ კრეატინს, რომელიც დამზადებული იყო სპეციალურ ბუფერზე (2.5 მმოლ გლიცინი + 2 მმოლ Na_2CO_3 + 0.2 მმოლ $MgSO_4$, pH 9.7). მიღებული მიქსტურის სუსპენზირება მოვახდინეთ 5 წუთის განმავლობაში, 37 ^{0}C გრადუსზე, შემდგომ კი მასში დავამატეთ 0.5 მლ (0.07 მმოლ) ატფ, რის შემდგომადაც ნარევის ინკუბაცია მოვახდინეთ კვლავ 37 ^{0}C გრადუსზე, 60 წუთის განმავლობაში. შემდგომ ხსნარში ვამატებთ 14%-იან ტრიქლორაცეტო მჟავას, რის შედეგადაც ფერმენტი წყვეტს აქტივობას. შემდგომ, მიღებული ხსნარი 10 წუთის განმავლობაში ცენტრიფუგირდება 3000 g-ზე. დაახლოებით 0.5 მლ სუპერნატანტი ერევა 0.5 მლ ნარევს, რომელიც შეიცავს ამონიუმის მოლიბდატსა და ამონიუმის ვანადატს, შეფარდებით 1:1. საბოლოოდ მიღებული ხსნარი, კერძოდ კი თავისუფალი ფოსფატის რაოდენობა, ისაზღვრება სპექტროფოტომეტრული ანალიზით, ტალღის სიგრძე λ = 400 ნმ [60].

2.13. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით

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

ექსპერიმენტის პირველ ეტაპზე 0.4 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვუმატებდით 2 მლ C რეაქტივს, რომელიც თავის მხრივ მზადდება A (NaHCO3-ის (უწყლო) 2%-იანი ხსნარი დამზადებული 1 N NaOH-ზე) და B (0.5%-იანი CuSO4 x 5H2O დამზადებული 1 %-იან

ნატრიუმის ციტრატზე) რეაქტივების ურთიერთშერევით (50:1). ვურევდით და ვაყოვნებდით 10 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე.

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

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

C = K x Eსაშ.(mg/ml)

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

2.14. მიღებული შედეგების სტატისტიკური ანალიზი

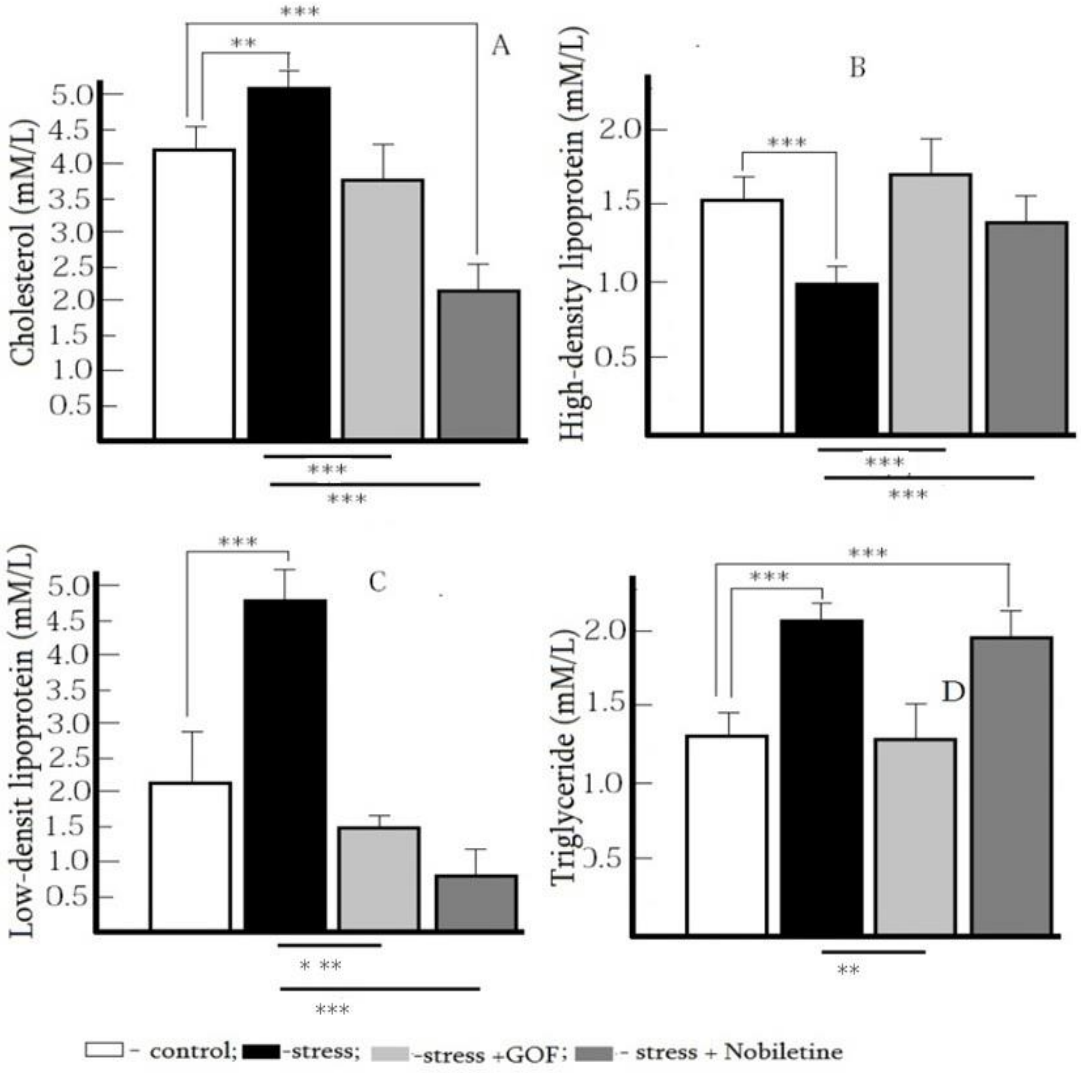
მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა One-way ANOVA-ს სტატისტიკური მეთოდის გამოყენებით (SPSS statistics, version 23, Chicago, IL). საშუალოთა შორის სარწმუნო განსხვავებების დასადგენად გამოყენებულ იქნა Tukey HSD და Games-Howellpost hoc ტესტები. შედეგები მოცემულია საშუალო ± SEM-ის სახით. შედეგები, რომელთა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

III. მიღებული შედეგები

III.1 ფლავონოიდების გავლენა სისხლის ლიპიდური სპექტრის ცვლილებაზე

ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე შესწავლილი იქნა ოთხივე საკვლევი ჯგუფის ცხოველების სისხლში ლიპიდური სპექტრის ცვლილება, რისთვისაც განისაზღვრა ქოლესტერინის, დაბალი და მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინებისა და ტრიგლიცერიდების შემცველობა. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 1, საიდანაც ჩანს, რომ ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ადგილი აქვს სისხლში ლიპიდების შემცველობის სარწმუნო ცვლილებას. კერძოდ, მატულობს თავისუფალი ქოლესტერინის, დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინებისა და ტრიგლიცერიდების რაოდენობა. ამის პარალელურად, შეინიშნება მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების რაოდენობის კლება, რაც თანხვედრაშია ლიტერატურულ მონაცემებთან, რომლებიც მიუთითებენ ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ანალოგიურ ცვლილებებს .

სტრესის პარალელურად, სეიკე ნაველის ჯიშის ფორთოხლის კანიდან გამოყოფილი ფლავონოიდური ექსტრაქის (GOF) ყოველდღიური ინტრაპერიტონიალური შეყვანა სარწმუნოდ ცვლის ამ შედეგებს, კერძოდ ამცირებს როგორც თავისუფალი ქოლესტერინის (≈30%), ასევე დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინებისა (≈70%) და ტრიგლიცერიდების (≈40%) შემცველობას. ამის საპირისპიროდ, აღინიშნება სტრესირებულ ცხოველების სისხლში მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების შემცველობის სარწმუნო მატება (≈118%). მსგავსი ეფექტი იქნა დაფისირებული ქრონიკული სტრესის პირობებში ნობილეტინის ხმარებისას. კერძოდ, ნობილეტინის შეყვანა ასევე სარწმუნდ ამცირებს ამცირებს სტრესის შედეგად გაზრდილი როგორც ქოლესტერინის (≈60%), ასევე დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების (≈80%) რაოდენობას, ტრიგლიცერიდების მაჩვენებელი პრაქტიკულად უცვლელია, ხოლო, ამის პარალელურად, გაზრდილია მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების რაოდენობა (≈70%).



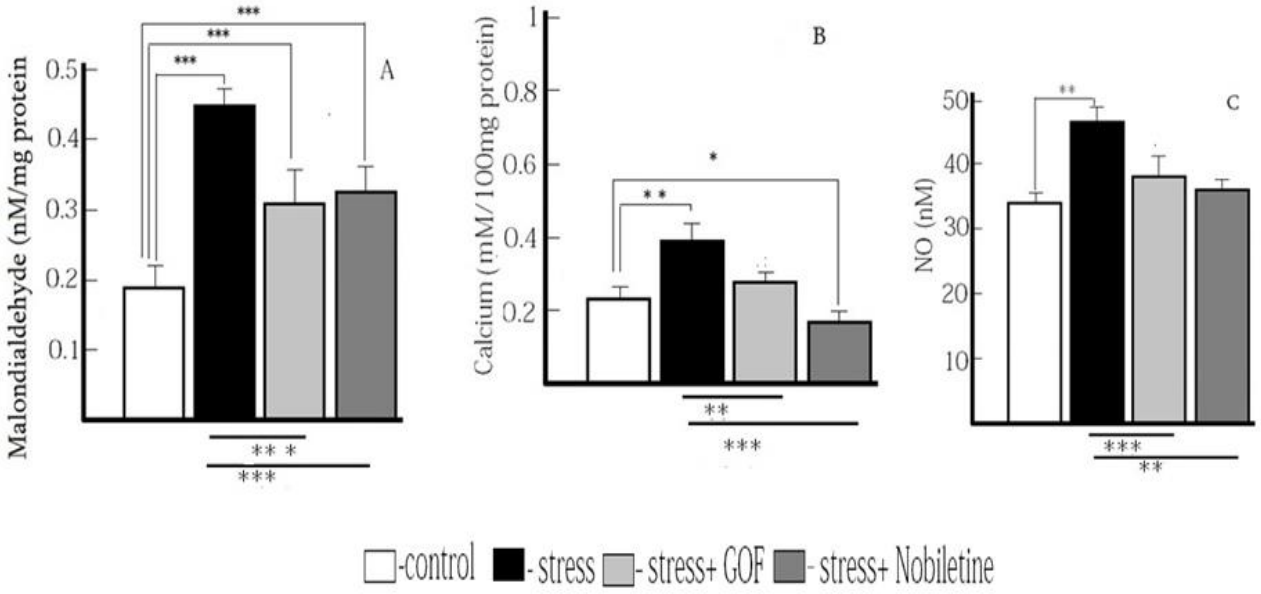
სურათი 1. *თავისუფალი ქოლესტერინის (A), მაღალი (B) და დაბალი (C) სიმკვრივის ლიპოპროტეინებისა და ტრიგლიცერიდების (D) შემცველობის ცვლილება სტრესირებული ვირთაგვების სისხლში GOF-სა და ნობილეტინის ხანგრძლივი დროით შეყვანის პირობებში*

*** - p<0.001, **-p<0.01.

III.2 მალონის დიალდეჰიდის, Ca^{2+}-ის იონებისა და აზოტის მონოოქსიდის რაოდენობრივი ცვლილებების დადგენა სისხლში

მიღებული მონაცემების გათვალისწინებით, შემდგომში ოთხივე საკვლევი ცხოველების სისხლში შევისწავლეთ ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის ინტენსივობა მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობის ცვლილების მიხედვით. სურათი 2A-ზე წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, რომ სტრესის პირობებში (II ჯგუფი) საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით აღინიშნება მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობრივი მაჩვენებლის ზრდა (≈70%). GOF-ის მიწოდება არეგულირებს ვირთაგვების სისხლში ამ მაჩვენებელს. კერძოდ, საკონტროლო მონაცემებთან შედარებით, მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობა მართალია რჩება სარწმუნოდ მომატებული, თუმცა სტრესირებულ ცხოველებთა შედარებით მისი რაოდენობა ასევე სარწმუნოდაა შემცირებული. ანალოგიური მონაცემები შეინიშნება ექსპერიმენტულ ვირთაგვებში ნობილეტინის შეყვანისას (IV ჯგუფი).

ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის შესწავლის შემდგომ, ოთხივე საკვლევი ჯგუფების ცხოველების სისხლში განისაზღვრა Ca^{2+}-ის იონების რაოდენობრივი მაჩვენებელი (სურ.2, B). როგორც მოსალოდნელი იყო, სტრესირებული ინდივიდების სისხლში სარწმუნოდაა გაზრდილი ამ იონის რაოდენობა, რომელიც მნიშვნელოვნად მცირდება როგორც GOF-ის (≈40%), ასევე ნობილეტინის (≈55%) შეყვანით. ცნობილია, რომ Ca^{2+}-ის იონი წარმოადგენს ფერმენტ NO-სინთაზას აქტივატორს, რაც კარგად გამოჩნდა ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებშიც. კერძოდ, სტრესის პირობებში სისხლში შეინიშნება NO-ს რაოდენობის საშუალოდ 45%-იანი მატება, რომელიც სარწმუნოდაა შემცირებული ორივე ფლავონოიდის გამოყენებისას (GOF - ≈20%, ნობილეტინი - 0 ≈25%) (სურ. 2, C).



სურათი 2. *სტრესირებული ცხოველების სისხლში მალონის დიალდეჰიდის (A), კალციუმის იონებისა (B) და აზოტის მონოოქსიდის (C) შემცველობის ცვლილება GOF-სა და ნობილეტინის შეყვანის პირობებში*

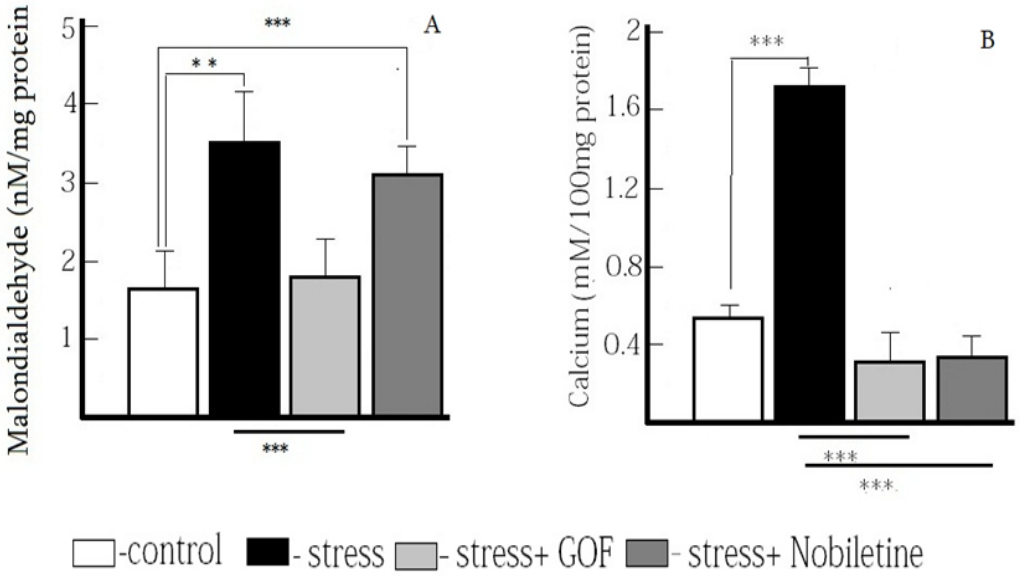
*** - p<0.001, **-p<0.01.

III.3. მალონის დიალდეჰიდისა და Ca^{2+}-ის იონებისა რაოდენობრივი ცვლილებების შესწავლა გულის კუნთის უჯრედებში

იმის გათვალისწინებით, რომ ჩვენი კვლევის ობიექტს ასევე წარმოადგენდა გული კუნთი, შემდგომში საკვლევ ჯგუფებში დადგენილი იქნა გულის კუნთის უჯრედებში, როგორც ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ინტენსივობა, ასევე Ca^{2+}-ის იონების რაოდენობრივი შემცველობაც. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია სურათზე 3. როგორც სურათიდან ჩანს, ხანგრძლივი ფსიო-ემოციური სტრესის პირობებში, გულის კუნთის უჯრედებში, საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით, ნათლად შეიმჩნევა ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ინტენსივობის მატება, კერძოდ ადგილი აქვს მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობის ზრდას. აღსანიშნავია, რომ ნობილეტინის შეყვანა არ ცვლის ამ მაჩვენებელს. ნობილეტინისგან განსხვავებით,

ინდივიდებში, რომლებიც სტრესის პირობებში ყოველდღიურად ინტრაპერიტონიალურად იღებდნენ GOF-ს (III ჯგუფი), აღენიშნებათ მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობის სარწმუნო დაქვეითება, რაც ჟანგვითი პროცესის ინტენსივობის შემცირების მაჩვენებლია.

რაც შეეხება Ca^{2+}-ის იონების რაოდენობრივ ცვლილებებს, მსგავსად სისხლის მაჩვენებლებისა, სტრესირებული ცხოველების გულის კუნთის უჯრედებში ამ იონის კონცენტრაცია სარწმუნოდ არის გაზრდილი, რომლის ნორმალიზირებას სტატისტიკურად სარწმუნოდ ახორციელებს როგორც GOF, ისევე ნობილეტინი.

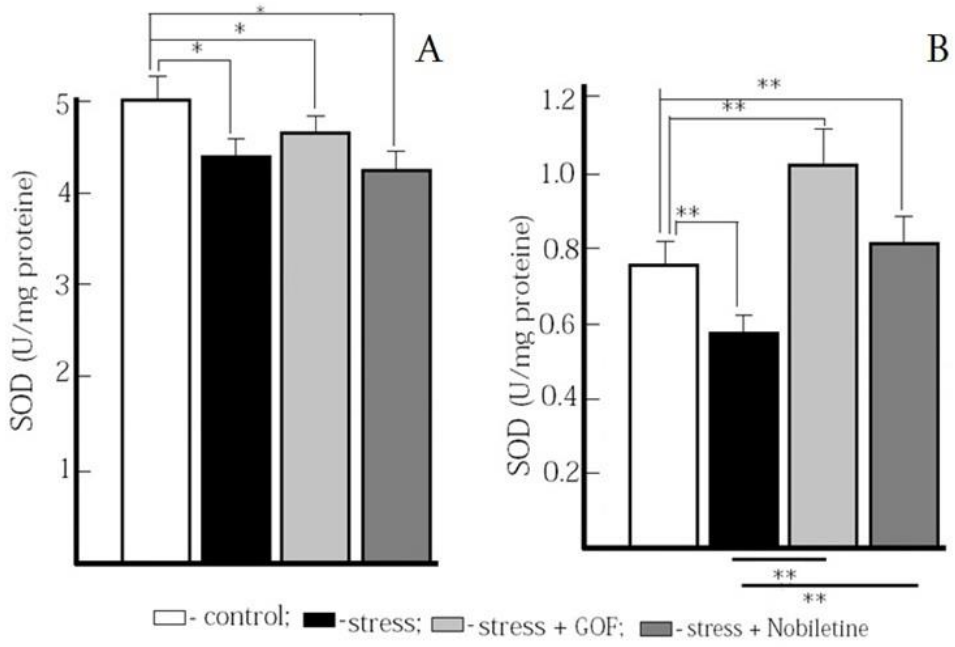


სურათი 3. *სტრესირებული ცხოველების გულის კუნთის უჯრედებში მალონის დიალდეჰიდისა (A) და კალციუმის იონებისა (B) შემცველობის ცვლილება GOF-სა და ნობილეტინის შეყვანის პირობებში*

*** - p<0.001, **-p<0.01.

III.4 ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის ცვლილება გულის კუნთის უჯრედებში

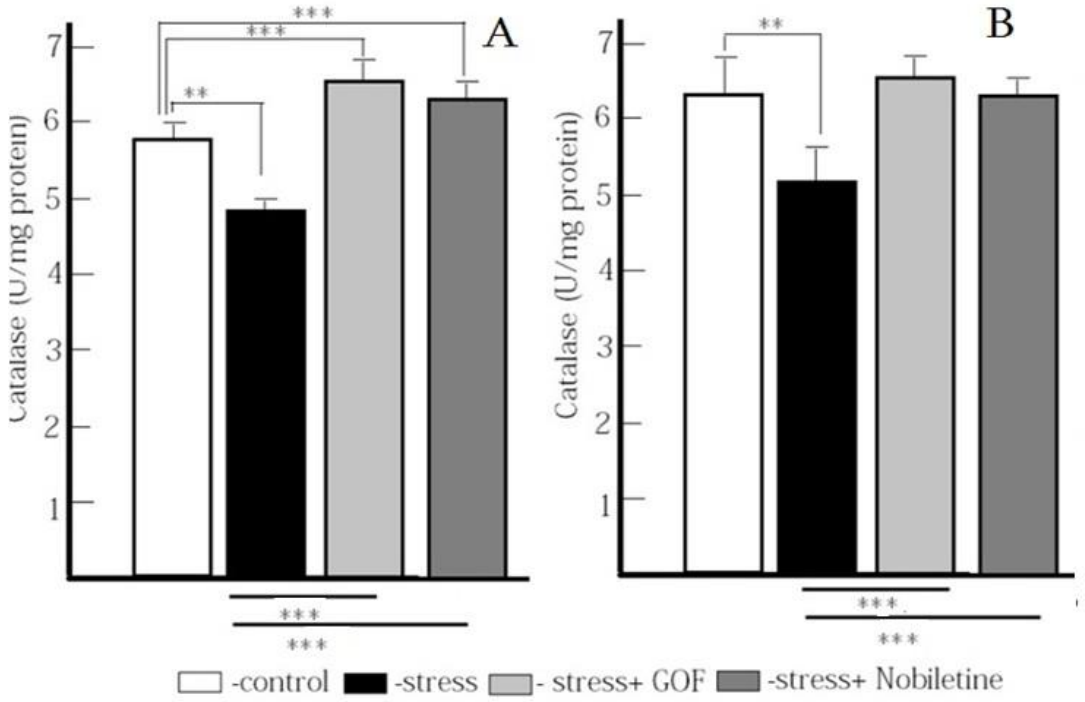
ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობის შესაფასებლად, გულის კუნთის უჯრედების ციტოპლაზმურ და მიტოქონდრიულ ფრაქციებში ჩვენს მიერ განისაზღვრა ამ სისტემის 2 ძირითადი ფერმენტის აქტივობის მაჩვენებელი, კერძოდ შესწავლილი იქნა ფერმენტ კატალაზასა და სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის ცვლილება. როგორც სურათი 4 გვიჩვენებს, სტრესირებულ ინდივიდების როგორც ციტოპლაზმურ, ასევე მიტოქონდრიულ ფრაქციაში, საკონტროლო ჯგუფის მაჩვენებელთან შედარებით, სარწმუნოდაა დაქვეითებული ფერმენტ სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობა. აღსანიშნავია, რომ როგორც GOF-ის, ასევე ნობილეტინის შეყვანის შემთხვევაში (III და IV ექსპერიმენტული ჯგუფი) ვერ იქნა ნანახი სარწმუნო ცვლილებები ამ ფერმენტის ციტოპლაზმური იზოფორმის აქტივობის კვლევისას (სურ. 4A). ციტოპლაზმური ფრაქციისაგან განსხვავებით, ფერმენტული აქტივობის სარწმუნო მატება აღინიშნება ფერმენტის მიტოქონდრიული იზოფორმის შემთხვევაში (სურ. 4B). კერძოდ, სტრესის მიმდინარეობის პარალელურად, როგორც GOF-ის, ასევე ნობილეტინის შეყვანა მნიშვნელოვნად ზრდის დაქვეითებული სუპეროქსიდდისმუტაზას მიტოქონდრიული იზოფორმის აქტივობას (≈24% და ≈26% შესაბამისად). აღსანიშნავია, რომ ამ შემთხვევაში ფერმენტული აქტივობის მაჩვენებელი გაზრდილია არა მარტო სტრესირებული ვირთაგვების მაჩვენებელთან შედარებით, არამედ შეინიშნება ფერმენტული აქტივობის სარწმუნო ზრდა საკონტროლო ჯგუფთან მიმართებაშიც.



სურათი 4. *ფერმენტ სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის ცვლილება გულის კუნთის უჯრედების ციტოლაზმასა (A) და მიტოქონდრიებში (B) ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში და მათი ცვლილება GOF-ითა და ნობილეტინით*

*** - p<0.001, **-p<0.01

შემდგომი ფერმენტი, რომელიც ჩვენს მიერ იქნა შესწავლილი, კატალაზაა. სურათზე 5 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებს, რომ ხანგრძლივი ფსიქოემოციური სტრესის პირობებში შეინიშნება ამ ფერმენტის აქტივობის სარწმუნო შემცირება როგორც ციტოპლაზმურ, ასევე მიტოქონდრიულ ფრაქციაშიც (სურ.5). ამავე დროს, ფერმენტის აქტივობის მატება GOF-ის დამატებით დამახასიათებელია მხოლოდ ციტოპლაზმური ფრაქციისათვის(სურ. 5A). რაც შეეხება მიტოქონდრიულ ფრაქციას, ფლავონოიდის შეყვანა სტრესის პირობებში სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ ცვლის ამ ფერმენტის აქტივობას (სურ. 5B). აღსანიშნავია, რომ მსგავსი მაჩვენებლები ფიქსირდება საკვლევი ცხოველების იმ ჯგუფშიც, სადაც ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესი მიმდინარეობდა ნობილეტის შეყვანის პირობებში.



სურათი 5. *ფერმენტ კატალაზას აქტივობის ცვლილება გულის კუნთის უჯრედების ციტოლაზმასა (A) და მიტოქონდრიებში (B) ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში და მათი ცვლილება GOF-ითა და ნობილეტინით*

*** - p<0.001, **-p<0.01

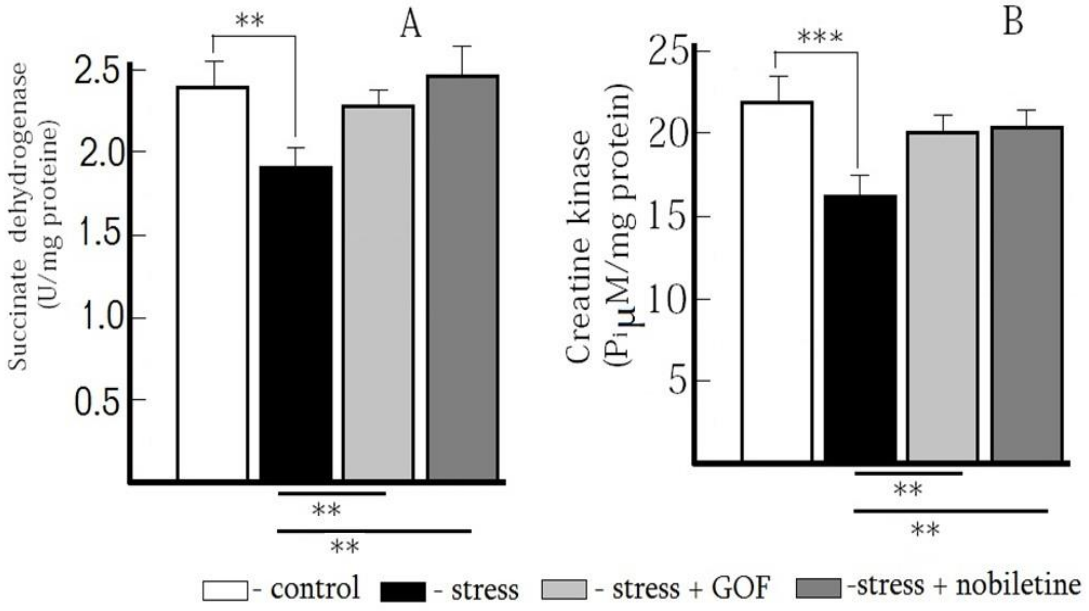
III.5 კრეატინკინაზასა და სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის ცვლილება გულის კუნთის უჯრედებში

ექსპერიმენტის შემდგომ სტადიაზე შესწავლილი იქნა GOF-ის გავლენა ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის მიმდინარეობაზე ამ პროცესში მონაწილე ფერმენტების კრეტინზინაზასა და სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის ცვლილების მაგალითზე გულის კუნთის უჯრედებში და მათ ცვლილებაზე GOF-ისა და ნობილეტინის გამოყენების პირობებში.

როგორც სურათი 6A-დან ჩანს, სტრესირებული ცხოველების გულის კუნთის უჯრედებში საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით შეინიშნება ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას

აქტივობის ≈27%-იანი სარწმუნო კლება და ეს სიდიდე ასევე სარწმუნოდ იზრდება როგორც GOF-ის, ისე ნობილეტინის ორგანიზმში შეყვანის პირობებში (≈28,5% და ≈37% შესაბამისად). აღსანიშნავია, რომ ფლავინოიდების გამოყენების შემთხვევაში ვერ იქნა ამ ფერმენტების სარწმუნო ცვლილება საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით.

მსგავსი შედეგებია მიღებული ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის კვლევის შემთხვევაშიც (სურ.6B). როგორც მიღებული შედეგებიდან იკვეთება ხანგრძლივი ფსიო-ემოციური სტრესი მნიშვნელოვნად ამცირებს ამ ფერმენტის ატივობას (≈29%) და ეს სიდიდე სარწმუნოდ იზრდება როგორც GOF-ის, ისე ნობილეტინის გამოყენებისას (≈19% და ≈25% შესაბამისად).



სურათი 6. *ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზასა(A) და კრეატინკინაზას(B) აქტივობის ცვლილება გულის კუნთის უჯრედების მიტოქონდრიებში ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში და მათი ცვლილება GOF-ითა და ნობილეტინით*

*** - p<0.001, **-p<0.01.

IV. მიღებული შედეგების განხილვა

როგორც ცნობილია, ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა და სოციალური იზოლაცია განიხილება როგორც სტრეს-ფაქტორები, რომლებიც სერიოზულ ალტერაციებს იწვევენ უჯრედში მიმდინარე მეტაბოლურ პროცესებში, რაც საბოლოოდ აისახება ორგანიზმის ფუნქციურ სტატუსსა თუ მდგომარეობაზე. მსგავსი სტრეს-ფაქტორებისადმი და მათ მიერ ინდუცირებული მეტაბოლური დარღვევებისადმი, საკმაოდ მაღალი მგრძნობელობითა თუ მოწყვლადობით გამოირჩევა გულ-სისხლძარღვოვანი სისტემა, რომელთა ქრონიკული გავლენის შედეგად ვითარდება ზემოთხსენებულ სისტემასთან დაკავშირებული არაერთი პათოლოგიური პროცესი, მათ შორის: კარდიომიოპათიები, გულის კორონალური დაავადებები და ა.შ. აქედან გამომდინარე, ისეთი საშუალებების მოძიება, რომლებსაც პოტენციურად აქვთ სტრესული კონდიციის პრევენციის უნარი, თანამედროვე სამეცნიერო საქმიანობის ერთ-ერთ ძირითად მიზანს წარმოადგენს. ამ მიმართულებით განსაკუთრებით საინტერესო არის ანტიოქსიდანტური და ანტიინფლამაციური თვისებების მქონე ნაერთები, რომელთა შორის ჩვენი ყურადღება განსაკუთრებით მიიქცია მცენარეებსა და სოკოებში წარმოდგენილმა, მეორეული მეტაბოლიტების ისეთმა დიდმა ჯგუფმა, როგორიც არის პოლიფენოლური ბუნების მქონე ფლავონოიდების დიდი ოჯახი. შესაბამისად, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა სეიკე ნაველის ჯიშის ფორთოხლის კანიდან მიღებული ფლავონოიდების სუმარული ექსტრაქტის პოტენციურად პროტექტორული თვისებების შესწავლა სოციალური იზოლაციითა და დღე- ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული ქრონიკული სტრესის პირობებში [8, 10, 13].

იქიდან გამომდინარე, რომ სოციალური იზოლაციისა და ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ქრონიკული სტრესის მიმართ, განსაკუთრებული მგრძნობელობით გულ-სისხლძარღვოვანი სისტემა გამოირჩევა, პირველ რიგში, ჩვენთვის საინტერესო იყო შეგვქმნოდა წარმოდგენა ამ სისტემის ფუნქციონირების ზოგად სტატუსზე, რის გამოც თავდაპირველად განისაზღვრა საკვლევი ობიექტების სისხლში ლიპიდური სპექტრის, კერძოდ კი :ქოლესტერინის, მაღალი და დაბალი სიმკვრივის ლიპოპორტეინებისა და ტრიგლიცერიდების რაოდენობრივი მაჩვენებლები და ალტერაციები. არაერთი ლიტერატურული მონაცემის თანახმად, ქრონიკური სტრესის პირობებში შეინიშნება სისხლის ლიპიდური სპექტრის მთელი რიგი მაჩვენებლების რაოდენობრივი ალტერაციები. კერძოდ, ცნობილია რომ ასეთ დროს იმატებს სისხლში თავისუფალი ქოლესტერინის, ტრიგლიცერიდებისა და დაბალი სიმკვრივის

ლიპოპროტეინების რაოდენობა, მაშინ როცა, მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების რაოდენობა მცირდება [61- 63]. ანალოგიური შედეგები აჩვენა ჩვენმა კვლევამ, სადაც ოთხივე მაჩვენებელი სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდებოდა საკონტროლო ჯგუფისგან. აღსანიშნავია, რომ როგორც GOF-ს, ისე ნობილეტინს, გააჩნია სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაკორექტირებელი გავლენა ქოლესტერინის, დაბალი და მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების რაოდენობრივ მაჩვენებელზე, მაშინ, როცა ტრიგლიცერიდების შემთხვევაში ნობილეტინისგან განსხვავებით, GOF-მა გამოავლინა სარწმუნოდ მაკორექტირებელი გავლენა.

ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციითა და ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეულ ქრონიკულ სტრესს ორგანიზმის სხვადასხვა სისტემაში, და მათ შორის, განსაკუთრებით გულ-სისხლძარღვოვან სისტემაში, თან ახლავს ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბება. იმ რადიკალებს შორის, რომლებიც ოქსიდაციური პროცესების განვითარების მიზეზი ხდება, განსაკუთრებით აღსანიშნავი არის პეროქსინიტრიტი და სუპეროქსიდი. თავის მხრივ, ცნობილია რომ პეროქსინიტრიტის ძირითად წყაროს აზოტის მონოოქსიდი (NO) წარმოადგენს, რომლის კონცენტრაციის მატება ოქსიდაციური სტრესის პირობებში სისხლის პლაზმაში არის ლიტერატურული მონაცემებითაა დადასტურებული [64,65].. სწორედ აქედან გამომდინარე, განვსაზღვრეთ მისი რაოდენობრივი ცვლილებები სისხლის პლაზმაში, რომელიც სარწმუნო ნორმალიზირებას ექვემდებარებოდა როგორც GOF-ის, ისე ნობილეტინის გამოყენების შემთხვევაში.

ცნობილია რომ ფერმენტ აზოტის მონოოქსიდის სინთაზას ენდოთელური იზოფორმის (eNOS) ერთ-ერთ აქტივატორს, Ca^{2+}-ის იონები წარმოადგენენ. ამის გათვალისწინებით რის გამოც, შემდგომ ეტაპზე, როგორც სისხლის პლაზმაში, ისე გულის კუნთის უჯრედებში, მოვახდინეთ ამ იონის რაოდენობრივი ცვლილების ესტიმირება. ორივე შემთხვევაში ნანახი იქნა, რომ როგორც GOF-ი, ისე ნობილეტინი, სარწმუნოდ ახორციელებს ამ იონის რაოდენობრივი ცვლილების ნორმალიზირებას, თუმცა საინტერესოა, რომ პლაზმის შემთხვევაში, ნობილეტინის მაკორექტირებელი გავლენა სტატისტიკურად რელევანტური იყო საკონტროლო ჯგუფთან მიმართებაშიც კი [64, 66].

ცნობილია, რომ ოქსიდაციური სტრესის პარალელურად, უჯრედში საკმაოდ ინტენსიურ ხასიათს იძენს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესი, რა დროსაც, განსაკუთრებით მაღალი ინტენსივობით იჟანგება პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავები, რომელთა ჟანგვის შუალედურ მეტაბოლიტს და ამასთან ერთად, ოქსიდაციური სტრესის უკვე აქტიურად გამოყენებულ ბიომარკერს, წარმოადგენს ენოლური ბუნების ორგანული ნაერთი, რომელსაც

მალონის დიალდეჰიდი ეწოდება [67, 68]. ოქსიდაციური სტრესის კვალ და კვალ მიმდინარე ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ინტენსივობაზე თვალსაჩინო წარმოდგენის შესაქმნელად, მომდევნო ეტაპზე სისხლის პლაზმასა და გულის კუნთის უჯრედებში განვსაზღვრეთ სწორედ მალონის დიალდეჰიდი რაოდენობრივი ცვლილებები. ნანახი იქნა, რომ მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობრივი ნორმალიზირება როგორც სისხლის პლაზმის, ასევე გულის კუნთის უჯრედების შემთხვევაში, საკმაოდ ეფექტურად მხოლოდ GOF-მა შეძლო, მაშინ როცა, ნობილეტინის მაკორექტირებელი, სარწმუნო გავლენა მხოლოდ სისხლის პლაზმის შემთხვევაში იქნა ნანახი.

ოქსიდაციური სტრესისა და ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ინტენსივობის შეფასებასთან ერთად, ოქსიდაციური სტატუსის განსაზღვრისათვის მეტად მნიშვნელოვანი არის ბიოლოგიური სისტემის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის შეფასება სხვადასხვა საკვლევ ჯგუფში. ამ შემთხვევაში ჩვენი ყურადღება მიიქცია ანტიოქსიდანტური სისტემის ორმა ძირითადმა, წამყვანნა ფერმენტმა, კერძოდ : სუპეროქსიდდისმუტაზამ და კატალაზამ. ცნობილი არის, რომ სუპეროქსიდდისმუტაზა მეტწილად განაპირობებს სუპეროქსიდ რადიკალის დისმუტაციას ჟანგბადად და წყალბადის ზეჟანგად. ფერმენტი მისი მნიშვნელობიდან და იზოფორმული მრავალფეროვნებიდან გამომდინარე, პრაქტიკულად ყველა ცოცხალი ორგანიზმის უჯრედში არის წარმოდეგენილი. რაც შეეხება კატალაზას, ამ ფერმენტის ძირითად ფუნქციას წყალბადის ზეჟანგის ნეიტრალიზირება წარმოადგენს. ამ შემთხვევაში, კატალაზა უნდა განვიხილოთ როგორ წყალბადის ზეჟანგის რაოდენობის წონასწორობის განმაპირობებელი ფაქტორი უჯრედის შემადგენლობაში, ზეჟანგის ფუნქციობრივი დუალობიდან გამომდინარე, კერძოდ კი H_2O_2 , ერთი მხრივ, საკმაოდ რეაქტიული ნაერთია, რომლის ჭარბი კონცენტრაცია განაპირობებს უჯრედული სტრუქტურების დესტრუქციისა და მათი ფუნქციური სტატუსის დაქვეითების პროცესებს, მაშინ როცა ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ეს უკანასკნელი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს უჯრედული ჰომეოსტაზის ფორმირებისა და შენარჩუნების პროცესში, რადგან წყალბადის ზეჟანგი მაგალითისთვის, მონაწილეობას იღებს არაერთი გენის ექსპრესიის რეგულაციაში, მათ შორის ანტიოქსიდანტური სისტემის შემადგენლობაში წარმოდგენილი ფერმენტების მაკოდირებელი გენებისა. მიღებული შედეგებით ნანახი იქნა, რომ სუპეროქსიდდისმუტაზას შემთხვევაში, კერძოდ კი ფერმენტის ციტოპლაზმური ფრაქციის შემთხვევაში, არც GOF-ს და არც ნობილეტინს, არ გააჩნია სარწმუნოდ მაკორექტირებელი გავლენა ფერმენტის აქტივობაზე, მაშინ როცა რადიკალურად განსხვავებული სურათი არის მიტოქონდრიული ფრაქციის შემთხვევაში, სადაც ფერმენტის აქტივობა სარწმუნოდ არის

ნორმალიზირებული როგორც GOF-ის, ასევე ნობილეტინის ჯგუფებში და უფრო მეტიც, ორივე ჯგუფში ფერმენტის აქტივობა არა მხოლოდ სტრესის, არამედ საკონტროლო ჯგუფთან მიმართებაშიც კი სარწმუნოდ კორექტირებულია. რაც შეეხება კატალაზას, ნანახი იქნა, რომ რომ ფერმენტის აქტივობა როგორც ციტპლაზმურ, ისე მიტოქონდრიული ფრაქციების შემთხვევაში, ორივე ჯგუფში (GOF და ნობილეტინი) სტატისტიკურად სარწმუნოდ არის ნორმალიზირებული, ციტოპლაზმური ფრაქციის შემთხვევაში, საკონტროლო ჯგუფთან მიმართებაშიც კი [27,29,30, 32, 69].

ცნობილია, რომ ოქსიდაციური სტრესი უარყოფითად აისახება უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმე და მიტოქონდრიებში მიმდინარე მეტაბოლურ პროცესებზე, ასეთ დროს ფერხდება კატაბოლური და ანაბოლური რეაქციები, მათ შორის სხვადსხვა ფერმენტებისა და ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების სინთეზისა და წარმოქმნის პროცესები. სწორედ აქედან გამომდინარე, ჩვენთვის საინტერესო იყო ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართული, ისეთი ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა, როგორებიცაა : სუქცინატდეჰიდროგენაზა და კრეატინკინაზა. ნანახი იქნა, რომ ორივე ფერმენტის აქტივობა საკონტროლო და სტრესის ჯგუფებს შორის სარწმუნოდ იქნა ალტერირებული, მაშინ როცა, სტრესის ჯგუფთან მიმართებაში, როგორც GOF-ი, ისე ნობილეტინი, სარწმუნოდ ახდენდა ფერმენტების აქტივობის ნორმალიზირებას [70-72].

დასკვნა

1. სეიკე ნაველის ჯიშის ფორთოხლის (Citrus sinensis (L.) Osbeck ,,Seike Navel”) კანიდან გამოყოფილი ფლავონოიდური ექსტრაქტი (GOF) გამოირჩევა მაღალი ანტიოქსიდანტური თვისებებითა და ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობაზე დადებითი ეფექტით.

2. რიგ შემთხვევაში GOF-ის გავლენა ცოცხალ სისტემაზე უფრო მაღალეფექტურია ვიდრე ციტრუსიდან გამოყოფილი ცნობილი კომერციული ფლავონოიდის - ნობილეტინის.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Menezo, Y. J. R., Silvestris, E., Dale, B., & Elder, K. (2016). Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*. http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.09.006
2. Ando, T., Mimura, K., Johansson, C. C., Hanson, M. G., Mougiakakos, D., Larsson, C., Kiessling, R. (2008). Transduction with the Antioxidant Enzyme Catalase Protects Human T Cells against Oxidative Stress. Journal of Immunology, *181*(12), 8382–8390. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8382
3. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004). "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?". Free Radical Biology & Medicine. **36** (7):838 https://doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.00
4. Lotito SB, Frei B (2006). "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?". *Free Radic. Biol. Med.* **41** (12): 1727–46. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.
5. Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM (2013). "Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **45** (12): 2821–2831. doi:10.1016/j.biocel.2013.10.004.
6. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (Nov 2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence". *Molecular and Cellular Biochemistry*. **266** (1–2): 37–56. doi:10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89
7. Szabo, S., Tache, Y., & Somogyi, A. (2012). The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the Editor#of Nature. *Stress*. http://doi.org/10.3109/10253890.2012.710919
8. Butler, G. (1993). Definitions of stress. *Occasional Paper (Royal College of General Practitioners)*.
9. 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.

10. Campeau, S., Liberzon, I., Morilak, D., & Ressler, K. (2011). Stress modulation of cognitive and affective processes. *Stress*. http://doi.org/10.3109/10253890.2011.596864

11. Radley, J. J., Kabbaj, M., Jacobson, L., Heydendael, W., Yehuda, R., & Herman, J. P. (2011). Stress risk factors and stress-related pathology: Neuroplasticity, epigenetics and endophenotypes. *Stress*. http://doi.org/10.3109/10253890.2011.604751

12. Stress, O., & Function, C. (2000). Forum : Signal Transduction OXIDATIVE STRESS AND CELL CYCLE CHECKPOINT FUNCTION. *Science*.

13. Of, R., Stress, O., Oxidation, P., The, I. N., & Process, A. (2002). Serial Review : Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease Guest Editor : Earl Stadtman ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND PROTEIN OXIDATION IN THE. *Science*. http://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01113-9.

14. Grippo, A. J., & Johnson, A. K. (2009). Stress, depression and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress*. http://doi.org/10.1080/10253890802046281.

15. Goldstein, D. S., & Mcewen, B. (2002). Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. http://doi.org/10.1080/10253890290001234 5

16. Kudielka, B. M., & Wüst, S. (2010). Human models in acute and chronic stress: Assessing determinants of individual hypothalamuspituitaryadrenal axis activity and reactivity. *Stress*. http://doi.org/10.3109/10253890902874913

17. Wsł, A., Cudnoch-Jedrzejewska, A., Szczepanska-Sadowska, E., Kowalewski, S., & Dobruch, J. (2009). Central oxytocin modulation of acute stress-induced cardiovascular responses after myocardial infarction in the rat. *Stress*. http://doi.org/10.3109/10253890802687688

18. Ondrejcakova, M., Bakos, J., Garafova, A., Kovacs, L., Kvetnansky, R., & Jezova, D. (2010). Neuroendocrine and cardiovascular parameters during simulation of stress-induced rise in circulating oxytocin in the rat. *Stress*. http://doi.org/10.3109/10253891003596822

19. Stress, O., Viral, I. N., & Hepatitis, A. (2003). Serial Review : Reactive Oxygen and Nitrogen in Inflammation Guest Editor : Giuseppe Poli. *Science*.

20. Stress, O., Septic, I. N., & Coagulation, I. (2002). Serial Review : Vascular Dysfunction and Free Radicals OXIDATIVE STRESS IN SEPTIC SHOCK AND DISSEMINATED. *Science*.

21. Halliwell, B. B., & Poulsen, H. E. (2006). Oxidative stress. In *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*. http://doi.org/10.1007/3-540-32232-9_1

22. Sies, H., & Jones, D. (2007). Oxidative Stress. In *Encyclopedia of Stress*. http://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3

23. Sailaja Rao, P., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*. http://doi.org/10.5530/ax.2011.4.2

24. Bhattacharya, S., Ahmed, K. M., & Chakraborty, S. (2011). Free Radicals and Cardiovascular Diseases: An Update. *Free Radicals and Antioxidants*. http://doi.org/10.2174/092986711795029717

25. Angaji, S. A., Mousavi, S. F., & Babapour, E. (2012). Antioxidants : A few key points. *Scholars Research Library Annals of Biological Research*.

26. Ookawara, T., Haga, S., Ha, S., Oh-Ishi, S., Toshinai, K., Kizaki, T., … Ohno, H. (2003). Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. *Free Radical Research*. http://doi.org/10.1080/1071576031000102132.

27. Huseynova, I. M., Bayramova, K. H., Suleymanov, S. Y., & Aliyev, J. A. (2013). *Free radicals and role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance in Zygophyllum Fabago, Phragmites australis, Argusia Sibirica L. and Eleagnus caspica plants. Handbook on Reactive Oxygen Species (ROS): Formation Mechanisms, Physiological Roles and Common Harmful Effects*.

28. Wang, J., & Lü, Y. (2009). Mitochondrial DNA 4977-bp deletion correlated with reactive oxygen species production and manganese superoxidedismutase expression in gastric tumor cells. *Chinese Medical Journal*.

29. Nicholls, P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. http://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.015

30. Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*. http://doi.org/10.1021/ja9018572

31. Scibior, D., & Czeczot, H. (2006). [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*.

32. Kauser, S., Westgate, G. E., Green, M. R., & Tobin, D. J. (2011). Human hair follicle and epidermal melanocytes exhibit striking differences in their aging profile which involves catalase. *Journal of Investigative Dermatology*. http://doi.org/10.1038/jid.2010.397

33. Bendich, A. (1996). Antioxidant Vitamins and Human Immune Responses. *Vitamins & Hormones*. http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60406-9

34. Tappel, A. L. (1962). Vitamin E as the Biological Lipid Antioxidant. *Vitamins and Hormones*. http://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60732-3

35. Handjieva-Darlenska, T., Hristova, K., & Singh, R. B. (2014). Antioxidant vitamins and the heart. *World Heart Journal*.

36. de Quadros, L. (2016). Ascorbic Acid and Performance: A Review. *Vitamins & Minerals*. http://doi.org/10.4172/2376-1318.1000136

37. Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). Antioxidant Vitamins and Minerals. In *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*. http://doi.org/10.1016/B978-0-12-405872-9.00015-X

38. Jiménez-Aguilar, D. M., & Grusak, M. A. (2017). Minerals, vitamin C, phenolics, flavonoids and antioxidant activity of Amaranthus leafy vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. http://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.005

39. Xu, G. H., Chen, J. C., Liu, D. H., Zhang, Y. H., Jiang, P., & Ye, X. Q. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*. http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00546.x

40. Romeo, R. D., Karatsoreos, I. N., Ali, F. S., & McEwen, B. S. (2007). The effects of acute stress and pubertal development on metabolic hormones in the rat. *Stress*. http://doi.org/10.1080/10253890701204270

41. Mattson, M. P. (2012). Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metabolism*. http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.012

42. Berthoud, H.-R. (2006). Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. http://doi.org/10.1038/oby.2006.308

43. Berthoud, H. R. (2003). Neural systems controlling food intake and energy balance in the modern world. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. http://doi.org/10.1097/01.mco.0000098084.40916.1f

44. Grotewold, E. (2006). *The science of flavonoids*. *The Science of Flavonoids*. http://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2

45. Winkel, B. S. J. (2006). The biosynthesis of flavonoids. In *The Science of Flavonoids*. http://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_3

46. Peer, W., & Murphy, A. (2006). Flavonoids as Signal Molecules. In *The Science of Flavonoids*. http://doi.org/DOI\t10.1007/978-0-387-28822-2_3

47. Peer, W., & Murphy, A. (2006). Flavonoids as Signal Molecules. In *The Science of Flavonoids*. http://doi.org/DOI\t10.1007/978-0-387-28822-2_3

48. Marais, J. P. J., Deavours, B., Dixon, R. A., & Ferreira, D. (2006). The stereochemistry of flavonoids. In *The Science of Flavonoids*. http://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_1

49. Middleton, E. (1998). Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function. In *Flavonoids in the Living System*. http://doi.org/10.1007/978-1-4615-5335-9_13

50. Pietta, P., & Simonetti, P. (1999). Dietary Flavonoids and Interaction with Physiologic Antioxidants. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012543590-1/50020-2

51. Rice-evans, C. (1999). Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. http://doi.org/10.1016/B978-012543590-1/50017-2

52. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. http://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9

53. Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. http://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02047-0

54. Beecher, G. R. (1999). Antioxidant Food Supplements in Human Health. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. http://doi.org/10.1016/B978-012543590-1/50019-6

55. Miller, A. L. (1996). Antioxidant flavonoids: Structure, function and clinical usage. *Alternative Medicine Review*.

56. Borges Bubols, G., da Rocha Vianna, D., Medina-Remon, A., von Poser, G., Maria Lamuela-Raventos, R., Lucia Eifler-Lima, V., & Cristina Garcia, S. (2013). The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. http://doi.org/10.2174/1389557511313030002

57. Williams, R. J., Spencer, J. P. E., & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*. http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001

58. El-Gengaihi, S. E., Hamed, M. A., Aboubaker, D. H., & Mossa, A. T. H. (2016). Flavonoids from sugar beet leaves as hepatoprotective agent. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.

59. Miyadera H, Shiomi K, Ui H, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, et al. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinateubiquinone oxidoreductase). PNAS 2003;100:473–7.

60. Zhuravliova E., Barbakadze T., Zaalishvili E., Chipashvili M., Koshoridze N., Mikeladze D. Social isolation in rats inhibits oxidative metabolism, decreases the content of mitochondrial K-

Ras and activates mitochondrial hexokinase. Beh. Brain Res. 205, 377–383, 2009.

61. Devaki, M., Nirupama, R., & Yajurvedi, H. N. (2013). Chronic stress-induced oxidative damage and hyperlipidemia are accompanied by atherosclerotic development in rats. *Stress*. http://doi.org/10.3109/10253890.2012.719052

62. Kim, Y.-W., & Byzova, T. V. (2014). Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. http://doi.org/10.1182/blood-2013-09-512749
63. Lee, Y.-S., Cha, B.-Y., Choi, S.-S., Choi, B.-K., Yonezawa, T., Teruya, T., … Woo, J.-T. (2013). Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.014

64. Li, H., Xia, N., & Förstermann, U. (2012). Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*. http://doi.org/10.1016/j.niox.2011.12.006

65. Trostchansky, A., Möller, M. N., Bartesaghi, S., Denicola, A., Botti, H., Radi, R., & Rubbo, H. (2010). Nitric Oxide Redox Biochemistry in Lipid Environments. *Nitric Oxide*. http://doi.org/10.1016/B978-0-12-373866-0.00002-2

66. Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Nakane, M., Förstermann, U., & Murad, F. (1992). Ca2+calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium*. http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160(92)90055-W

67. Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomości Lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*.

68. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. http://doi.org/10.1155/2014/360438

69. An, L., Zhao, T., Yan, X., Zhou, X., & Tan, P. (2015). The dual role of hydrogen peroxide in fuel cells. *Science Bulletin*. http://doi.org/10.1007/s11434-014-0694-7

70. Holzer, H. (1970). Some aspects of regulation of metabolism by ATP. *Advances in Enzyme Regulation*. http://doi.org/10.1016/0065-2571(70)90010-5

71. Bais, R., & Edwards, J. B. (1982). Creatine kinase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. http://doi.org/10.3109/10408368209107030

72. Kim, H. J., & Winge, D. R. (2013). Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. http://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.01.012