ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

# ფერმენტ კატალაზას აქტივობის შესწავლა ვირთაგვას თავის ტვინსა და ღვიძლში ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით

**ნათია დათუნაშვილი**

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი,
ბიოლოგიის დეპარტამენტი, გამოყენებითი ბიომეცნიერებებისა და
ბიოტექნოლოგიის საბაკალავრო პროგრამა

**ხელმძღვანელი:** ბიოლოგიის დეპარტამენტის
ასოცირებული პროფესორი
ზურაბ ქუჩუკაშვილი

თბილისი
2022 წელი

# სარჩევი

## Contents


ანოტაცია ..... 3

Abstract ..... 4

შესავალი ..... 5

ლიტერატურის მიმოხილვა ..... 7

ჟანგბადის აქტიური ფორმები ..... 7

ჟანგბადის აქტიური ფორმების გავლენა ცოცხალ ორგანიზმზე ..... 8

წყალბადის ზეჟანგი ..... 9

ანტიოქსიდანტური სისტემები ..... 10

კატალაზა ..... 11

ფლავონოიდები როგორც ანტიოქსიდანტები ..... 13

კვლევის ობიექტი ..... 16

გამოყენებული მეთოდები ..... 16

ჰომოგენიზაცია და სუპერნატანტის ნიმუშის აღება ..... 16

სპექტროფოტომეტრია ..... 18

ცილის კონცენტრაციის გაზომვა ლოურის მეთოდით ..... 19

ფერმენტ კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა ვირთაგვის ღვიძლისა და ტვინის ჰომოგენატებში კლასიკური მეთოდით ..... 20

ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენება ფერემენტი კატალაზას აქტივობის შესაფასებლად ..... 22

მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაციის განსაზღვრა ვირთაგვას ღვიძლისა და თავის ტვინის ჰომოგენატებში ..... 24

კვლევის შედეგების სტატისტიკური დამუშავება ..... 25

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა ..... 26

დასკვნები ..... 34

გამოყენებული ლიტერატურა ..... 35

# ანოტაცია


თანამედროვე მედიცინაში არსებობს ძლიერი მეცნიერული საფუძველი იმის შესახებ, რომ ოქსიდაციური სტრესი ადამიანებში მრავალი ქრონიკული დაავადების გამომწვევ ერთ–ერთ უმნიშვნელოვანეს ფაქტორს წარმოადგენს. ამ დაავადებებს შორისაა სიმსივნე, დიაბეტი და გულ–სისხლძარღვთა სისტემის დარღვევები. ოქსიდაციური სტრესი ვითარდება ორგანიზმში ჭარბად წარმოქმნილ თავისუფალ რადიკალებსა და ანტიოქსიდანტებს შორის არსებული დისბალანსის დროს. თავისუფალი რადიკალები, უჯრედებში ნორმალური მეტაბოლიზმის დროს წარმოიქმნებიან, მაგრამ მათი ჭარბი რაოდენობით წარმოქმნისას, ისინი რეაქციაში შედიან ისეთ ბიომოლეკულებთან, როგორიცაა ნუკლეინის მჟავები, ცილები და ლიპიდები, და აზიანებენ მათ.

უჯრედებში ფუნქციონირებენ ძლიერი ანტიოქსიდანტური სისტემები, რომლებიც ანეიტრალებენ თავისუფალი რადიკალების დამაზიანებელ მოქმედებას. ანტიოქსიდანტური მოქმედება ახასიათებს ფერმენტებს, ვიტამინებს, ფენოლურ ნაერთებს და ა.შ. ანტიოქსიდანტურ ფერმენტებს შორის ორგანიზმში ოქსიდაციური სტრესის თავიდან ასარიდებლად უმნიშვნელოვანეს როლს ერთ–ერთი ფერმენტი კატალაზა თამაშობს. არაფერმენტულ ანტიოქსიდანტებს შორის საყურადღებოა მცენარეებში წარმოქმნილი მეორადი მეტაბოლიტები, ფლავონოიდები. ისინი ორგანიზმში მოხვედრისას მოქმედებენ როგორც თავისუფალი რადიკალების შემბოჭავები და გამანეიტრალებლები.

აღსანიშნავია, რომ ნორმის ფარგლებში არის თუ არა რაიმე ურთიერთდამოკიდებულება ფერმენტულ და არაფერმენტულ ანტიოქსიდანტურ სისტემებს შორის დღემდე არ არის სრულყოფილად შესწავლილი. შესაბამისად ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ვირთაგვის ღვიძლსა და თავის ტვინში ფერმენტი კატალაზას აქტივობა ორგანიზმზე ფლავონოიდების ჭარბი ზემოქმედების შედეგად.

ზემოთ ხსენებული მიზნის მისაღწევად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები: შევარჩიეთ ვირთაგვების 3 საკვლევი ჯგუფი, რომლებზეც ინექციის საშუალებით არაერთჯერადად ვმოქმედებდით სხვადასხვა ფლავონოიდებით. მოვახდინეთ შერჩეული ჯგუფებიდან საკვლევი მასალის აღება (კერძოდ თავის ტვინი და ღვიძლი). შემდეგ ეტაპზე კი, საკვლევი ქსოვილებიდან მივიღეთ შესაბამისი ჰომოგენატი და სამუშაო ფრაქციები. საკვლევ ფრაქციებში განვსაზღვრეთ ფერმენტ კატალაზას აქტივობა და შევისწავლეთ ანტიოქსიდანტური სტატუსი. მოვახდინეთ მიღებული მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება და ანალიზი.

# Abstract

In modern medicine there is strong evidence that suggests that oxidative stress plays crucial role in the pathogenesis of many chronic diseases. Cancer, diabetes and cardiovascular diseases are among them. Oxidative stress is caused by imbalance between free radicals and antioxidants in organisms. Free radicals are produced in living organisms naturally as a byproduct of normal metabolism, but if they accumulate excessively, these molecular species are capable of negatively affecting biomolecules such as nucleic acids, proteins and lipids by damaging their structure.

Fortunately, the cells have strong antioxidant mechanisms, that neutralize harmful effects of free radicals. Molecules that have antioxidant properties are various enzymes, vitamins, flavonoids, etc. Among the enzymatic antioxidants, catalase is known to play an extremely important part in mitigating oxidative stress. As for the nonenzymatic antioxidants, flavonoids, the secondary metabolites found in plants, arouse great interest. Once flavonoids enter the cells, they act as the scavengers and inhibitors of free radicals.

It must be pointed out, that the relations between enzymatic and nonenzymatic antioxidants, in normal conditions, are yet to be studied thoroughly. Therefore, the aim of this research was to observe and study the activity of catalase in rat liver and brain, after injecting the study objects with excessive flavonoids.

To achieve the said aim for our research, several goals were set. Firstly, we chose three study groups of rats and injected them daily (over 5 days) with different types of flavonoids. Afterwards, we took the samples of interest from brain and liver and acquired the fractions by homogenizing the tissues. Lastly, we determined catalase activity in the fractions and studied their antioxidant properties. The results of the study were analyzed statistically.

# შესავალი

ჟანგვითი პროცესები ცოცხალ ორგანიზმებში ნორმალურ პირობებში მუდმივად მიმდინარეობს და ის სიცოცხლისთვის უმნიშვნელოვანეს ბიოქიმიურ მოვლენას წარმოადგენს. ამის მიუხედავად, მაშინ როდესაც ორგანიზმში რაიმე ფაქტორის ზეგავლენით ირღვევა პროოქსიდანტებსა და ანტიოქსიდანტებს შორის არსებული ბალანსი, ვითარდება ოქსიდაციური სტრესი. პროოქსიდანტები წარმოადგენენ ქიმიურ ნაერთებს, რომლებიც განაპირობებენ თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნას, ან ანტიოქსიდანტური სისტემების ინჰიბირებას. თავისუფალი რადიკალები კი რეაქტიული მოლეკულებია, რომელთაც გარე შრეზე გააჩნიათ გაუწყვილებელი ელექტრონები. ეს მათ საშუალებას აძლევს რეაქციაში ადვილად შევიდნენ სხვა ბიომოლეკულებთან (ცილები, ლიპიდები, დნმ) და დააზიანონ ისინი.

თავისუფალი რადიკალების დიდი რაოდენობით დაგროვება ორგანიზმში იწვევს ოქსიდაციური სტრესის დადგომას, რაც მრავალი კვლევის თანახმად წარმოადგენს არა ერთი ქრონიკული დაავადების განვითარების საფუძველს. ამ დაავადებებს შორის არის : დიაბეტი, სიმსივნეები, ათეროსკლეროზი, გულ–სისხლძარღვთა სისტემების დარღვევები და ა.შ. მიუხედავად იმისა რომ ორგანიზმი ნორმალურ პირობებში თავად წარმოქმნის თავისუფალ რადიკალებს, ისინი შესაძლოა ჭარბად მოხვდნენ გარემოდანაც. მსგავსი თავისუფალი რადიკალების წყაროს წარმოადგენს : სიგარეტის კვამლი, რადიაცია, დამაბინძურებლები და პესტიციდები. გარდა ამისა, პროცესს ხელს უწყობს არასწორი კვება, დიდი რაოდენობით შაქრის, ცხიმების და ალკოჰოლური სასმელების მიღებაც.

აღსანიშნავია, რომ ორგანიზმში ოქსიდაციური სტრესის თავიდან ასაცილებლად მოქმედებენ ანტიოქსიდანტური სისტემები. ენდოგენური ანტიოქსიდანტები, რომლებიც ორგანიზმის მეტაბოლიზმის პროდუქტებს წარმოადგენენ, შესაძლოა იყოს ფერმენტული და არაფერმენტული. ფერმენტული ანტიოქსიდანტებია კატალაზა, გლუტათიონ პეროქსიდაზა, გლუტათიონ რედუქტაზა და ა.შ. ენდოგენურ არაფერმენტულ ანტიოქსიდანტებს კი წარმოადგენენ გლუტათიონი, უბიქინონი, შარდის მჟავა, ბილირუბინი და ა.შ.

ოქსიდაციური სტრესისგან თავის დასაცავად ფერმენტულ ანტიოქსიდანტებს შორის უმნიშვნელოვანეს როლს თამაშობს კატალაზა. ეს ფერმენტი ცოცხალი ორგანიზმების უმეტესობაში გვხვდება. კატალაზას ანტიოქსიდანტური თვისება გამოიხატება მის უნარში დაშალოს თავისუფალი რადიკალების ყველაზე აქტიური

ფორმების წყარო, წყალბადის ზეჟანგი, წყლად და მოლეკულურ ჟანგბადად. შესაბამისად იგი მონაწილეობას იღებს უჯრედებში ამ მოლეკულის ოპტიმალური დონის შენარჩუნებაში.

გარდა ორგანიზმში წარმოქმნილი ენდოგენური ანტიოქსიდანტებისა, მრავალ საკვებში, მათ შორის ხილში, ბოსტნეულში, სასმელებში, დიდი რაოდენობით არის წარმოდგენილი ეგზოგენური ანტიოქსიდანტები. ამ ანტიოქსიდანტებს შორის მნიშვნელოვანია: ვიტამინები C და E, კაროტინოიდები, ფლავონოიდები, მელატონინი და ა.შ. არსებობს მოსაზრება, რომ საკვების რაციონში მსგავსი ანტიოქსიდანტების მაღალი რაოდენობით არსებობა დადებით გავლენას ახდენს ადამიანის ჯანმრთელობაზე, აფერხებს დაბერების პროცესს და ხელს უშლის ისეთი პათოლოგიების განვითარებას როგორიცაა მაგ. დიაბეტი.

დღესდღეობით კარგად არის შესწავლილი ფერმენტული და არაფერმენტული ანტიოქსიდანტური სისტემების მოქმედება, მაგრამ ნაკლებად არის კვლევები იმის შესახებ, არის თუ არა რაიმე ურთიერთდამოკიდებულება ნორმის მდგომარეობაში ამ ორ სისტემას შორის. ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ენდოგენური ფერმენტული ანტიოქსიდანტის, კატალაზას აქტივობა ვირთაგვის თავის ტვინსა და ღვიძლში სხვადასხვა ფლავონოიდების ზემოქმედებით.

დასახული მიზნის მისაღწევად ჩვენ გამოვყავით ვირთაგვების სამი საკვლევი ჯგუფი და მოვახდინეთ მათში ქართული ჯიშის ყურძნის საფერავიდან გამოყოფილი ფლავონოიდური ფრაქციისა და სუფთა ქვერცეტინის არაერთჯერადი ინექცია (საბოლოო კონცენტრაციით 20 მგ/კგ). ხუთ დღიანი ინექციის შემდეგ  მოხდა მათი დეკაპიტაცია და საკვლევი ნიმუშების აღება. ფერმენტი კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა მოხდა ჯერ კლასიკური, სპექტროსკოპიური მეთოდით, შემდგომ კი შესწავლილი იქნა ნიმუშებში წყალბადის ზეჟანგით ინიცირებული ჟანგვითი პროცესები ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით. მოვახდინეთ მიღებული შედეგების სტატისტიკური დამუშავება, ანალიზი და ინტერპრეტაცია.

# ლიტერატურის მიმოხილვა

## ჟანგბადის აქტიური ფორმები

ოქსიდაციური სტრესი წარმოადგენს დისბალანსს ჟანგბადის აქტიური ფორმების (ROS) წარმოქმნისა და ელიმინაციის პროცესებს შორის. ორგანიზმში ჟანგბადის აქტიური ფორმები ნორმალურ ფიზიოლოგიურ პირობებში მუდმივად წარმოიქმნება და ჩართულია არაერთ უჯრედულ პროცესში. გასული საუკუნის ბოლოს აღმოჩენილი იქნა, რომ ისინი სასიგნალო მოლეკულების როლს ასრულებენ და ჩართულები არიან სხვადასხვა ბიოლოგიური და ფიზიოლოგიური პროცესების რეგულირებაში. მიუხედავად მათი სასარგებლო ფუნქციებისა, ჟანგბადის აქტიური ფორმების ჭარბად წარმოქმნა იწვევს უჯრედების დაზიანებასა და პათოლოგიების განვითარებას, ვინაიდან ისინი აზიანებენ ნუკლეინის მჟავებს, ლიპიდებსა და ცილებს. სწორედ ორგანიზმში გავნითარებულ ამ პათოლოგიურ მდგომარეობას ეწოდება ოქსიდაციური სტრესი.

ჟანგბადის აქტიური ფორმების ჭარბად წარმოქმნას რამდენიმე ფაქტორი იწვევს. ეს შეიძლება გამოწვეული იყოს გარკვეული პრეპარატებით, ROS-წარმომქმნელი ფერმენტების ინტენსიური ექსპრესიით, მაიონიზებელი რადიაციით ან ორგანიზმში ანტიოქსიდანტური ფერმენტების ნაკლებობით. ჟანგბადის აქტიური ფორმების მაგალითებია : წყალბადის ზეჟანგი, ჰიდროქსილის რადიკალი, სუპეროქსიდანიონის რადიკალი და ა.შ. (1)

ცნობილია, რომ ატომი ბირთვისა და მის გარშემო სხვადასხვა შრეზე განლაგებული უარყოფითად დამუხტული ელექტრონებისგან შედგება. ბირთვთან ყველაზე სუსტად გარე შრის ელექტრონებია დაკავშირებული. სწორედ ეს ელექტრონები იღებენ მონაწილეობას ჟანგვა–აღდგენით რეაქციებში და ამყარებენ ქიმიურ ბმებს. ელექტრონების გაცემის ან მიერთების დროს ხდება იონური ბმის დამყარება, ხოლო საზიარო ელექტრონული წყვილით წარმოიქმნება კოვალენტური ბმა. თავისუფალი რადიკალები წარმოიქმნება იმ შემთხვევაში, თუ რაიმე ფაქტორის ზემოქმედებით ეს ბმები წყდება და მოლეკულას გარე შრეზე რჩება გაუწყვილებელი ელექტრონი. ხდება ჯაჭვური პროცესის ინიცირება, ვინაიდან წარმოქმნილი რადიკალი სხვა სტაბილურ მოლეკულას ართმევს ელექტრონს, შემდეგ კი ეს უკანასკნელი გარდაიქმნება რადიკალად და ურთიერთქმედებს სხვა

მოლეკულასთან. თავისუფალ რადიკალებს გააჩნიათ პოტენციალი მოახდინონ ნებისმიერი ტიპის უჯრედული ბიომოლეკულის ოქსიდაცია.

ჟანგბადის აქტიური ფორმები ნორმალურ პირობებში მეტაბოლიზმის დროს წარმოიქმნებიან. მათ შორის ყველაზე აქტიური ფორმები წარმოიქმნება სუნთქვითი ჯაჭვის მიმდინარეობისას. ამ დროს ხდება ელექტრონის გაჟონვა სატრანსპორტო ჯგუფიდან. მაგალითად, $Fe^{+2}$ –ის დაჟანგვისას $Fe^{+3}$-მდე, ელექტრონი შეიძლება ჟანგბადს მიუერთდეს და წარმოიქმნას სუპეროქსიდრადიკალი. ამ უკანასკნელს უნარი აქვს ჩაერთოს შემდგომ გარდაქმნების ჯაჭვში და წარმოქმნას სხვა ისეთი რადიკალები, როგორიცაა ჰიდროქსილის რადიკალი. ($OH^-$)

$O^{-2} + H_2O \rightarrow O_2 + OH^-$

ძალიან ხშირად წყალი განიცდის რადიოლიზს, რის შედეგადაც კარგავს ელექტრონს და მიიღება თავისუფალი ელექტრონი და იონიზებული მოლეკულა :

$H2O + h\nu \rightarrow H2O^+ + e^-$

მიღებული თავისუფალი ელექტრონი შესაძლოა დაუკავშირდეს წყლის სხვა მოლეკულას :

$H2O + e^- \rightarrow H2O^-$

იონიზირებული წყლის მოლეკულა ჰიდროლიზს განიცდის რის შედეგადაც წარმოიქმნება ატომური წყალბადის რადიკალი და აქტიური ჰიდროქსილის რადიკალი :

$H2O^+ \rightarrow H^+ + OH\cdot$

ჟანგბადის თანაობისას კი შესაძლოა წარმოიქმნას ისეთი სხვა დამჟანგავი თვისების პროდუქტები, როგორიცაა მაგ. წყალბადის ზეჟანგი ($H_2O_2$)

## ჟანგბადის აქტიური ფორმების გავლენა ცოცხალ ორგანიზმზე

გააქტიურებული ჟანგბადის ფორმები ძლიერ აზიანებენ სტაბილურ მოლეკულებს და ინიცირებენ სხვადასხვა ფერმენტულ თუ არაფერმენტულ რეაქციებს.

ROS–ის დნმ–თან ურთიერთქმედების დროს, გუანინი გარდაიქმნება 9–ოქსიგუანინად. მსგავსი სტრუქტურა მას საშუალებას აძლევს დაუკავშირდეს ციტოზინსა და ადენინს. ეს მუტაცია როგორც ბირთვულ, ასევე მიტოქონდრიულ დნმ–ში შესაძლოა

განვითარდეს და გამოიწვიოს გენომური არასტაბილურობა. ცილებთან ურთიერთქმედების დროს ხდება ამინომჟავების გვერდითი ჯაჭვების ოქსიდაცია, რის შედეგადაც იცვლება ცილის სტრუქტურა და მან შეიძლება თავისი ფუნქცია მთლიანად დაკარგოს. (2)

განსაკუთრებით მგრძნობიარეები ჟანგბადის აქტიური ფორმების მიმართ არიან ცხიმოვანი მჟავები, ორმაგი ბმებით. ლიპიდები, რომლებიც მსგავს ცხიმოვან მჟავებს შეიცავენ ჟანგბადის აქტიური ფორმებისგან იღებენ ელექტრონს და გარდაიქმნებიან თავისუფალ რადიკალად. ამ მოვლენას ეწოდება ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგა. იწყება თავისუფალი რადიკალების გენერირება. ეს პროცესი იწვევს უჯრედული მემბრანის დაზიანებას და სხვადასხვა უჯრედული პროცესების დარღვევებს.

ჟანგბადის აქტიური ფორმების მაღალი კონცენტრაცია ორგანიზმში იწვევს ისეთ მოვლენებს, როგორიცაა უჯრედების გაყოფის ინჰიბირება, აქტიურდება უჯრედის აპოპტოზი, იწყება ორგანიზმში დაბერების პროცესები.

## წყალბადის ზეჟანგი

მედიცინაში წყალბადის ზეჟანგი ხშირად გამოიყენება როგორც ინფექციის საწინააღმდეგო საშუალება მაგ. ჭრილობების გასუფთავების დროს. ამის მიზეზი ის არის, რომ ის ძლიერი დამჟანგავია და მიკროორგანიზმების დახოცვის უნარი აქვს. ენდოგენური წყალბადის ზეჟანგი უჯრედში მიმდინარე ჟანგვა–აღდგენითი რეაქციების მნიშვნელოვან კომპონენტს წარმოადგენს და აქტიურად არის ჩართული უჯრედულ პროცესებში. (3)

წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნა უჯრედში ხდება სუპეროქსიდ ანიონის გარდაქმნით (დისმუტაციით). ეს ფერმენტი ლოკალიზებულია მიტოქონდრიაში, ციტოზოლსა და უჯრედგარე სივრცეში. როგორც უკვე აღინიშნა, წყალბადის ზეჟანგი სხვა რეაქტიულ ნაერთებთან შედარებით მდგრადია და არხების გავლით ადვილად გადაადგილდება მემბრანებს მიღმა. დიდი მნიშვნელობა აქვს უჯრედში არსებული წყალბადის ზეჟანგის კონცენტრაციას. ეს მაჩვენებლი ხშირად უჯრედის ტიპის მიხედვით განსხვავებულია. საშუალოდ, ნორმალურ პირობებში წყალბადის ზეჟანგის კონცენტრაცია უჯრედში არის 1–100 nM. უფრო მაღალმა კონცენტრაციამ შეიძლება გამოიწვიოს აპოპტოზის ინიცირება.

წყალბადის ზეჟანგი განსაკუთრებული ინტენსივობით წარმოიქმნება მიტოქონდრიაში სუნთქვითი ჯაჭვის მიმდინარეობისას მაშინ, როდესაც სუპეროქსიდის ანიონი ($O_2^{-}$) ფერმენტი სუპეროქსიდ დისმუტაზას (SOD) მოქმედებით განიცდის დისმუტაციას. მიტოქონდრიის მატრიცაში წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგი რკინის ან სპილენძის იონებთან ურთიერთქმედების შემთხვევაში იშლება და წარმოქმნის ROS ყველაზე აქტიურ ფორმას – ჰიდროქსილის რადიკალს (ფენტონის რეაქცია) :

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + HO^{-} + OH^{-}$$

წარმოქმნილ ჰიდროქსილის რადიკალს უნარი აქვს რეაქციაში შევიდეს ყველა ტიპის მოლეკულასთან : ლიპიდებთან, პოლიპეპტიდებთან, ნუკლეინის მჟავებთან და დაარღვიოს მათი სტრუქტურა. მათ უნარი აქვთ გაწყვიტონ ცილებში არსებული დისულფიდური ბმები, დააზიანონ უჯრედის მემბრანა და გამოიწვიონ ისეთი დარღვევები როგორიცაა ათეროსკლეროზი, სიმსივნე და სხვადასხვა ნევროლოგიური პათოლოგიები. აღსანიშნავია, რომ თავად ჰიდროქსილის რადიკალი იმდენად რეაქტიულია, რომ ვერცერთი ფერმენტული სისტემა ვერ იყენებს მას თავის სუბსტრატად, რის გამოც მისი რაოდენობის რეგულირება უჯრედში ნორმალურ პირობებში ხდება წყალბადის ზეჟანგის დაშლით.

## ანტიოქსიდანტური სისტემები

ოქსიდაციური სტრესისაგან თავის დასაცავად ორგანიზმში არსებობს ანტიოქსიდანტური სისტემები, რომელთაც უნარი აქვთ ხელი შეუშალონ ან შეაფერხონ მოლეკულების ჟანგვითი პროცესები. ანტიოქსიდანტები არიან სტაბილური მოლეკულები, რომლებიც აინჰიბირებენ თავისუფალი რადიკალების მოქმედებას. მათ უნარი აქვთ მიიღონ და გასცენ ელექტრონები და გაანეიტრალონ რადიკალები ისე, რომ თავად აქტიურ რადიკალად არ გარდაიქმნან. ანტიოქსიდანტების ნაწილი სხეულში მეტაბოლიზმის შედეგად სინთეზირდება (ენდოგენური ანტიოქსიდანტები), ზოგიერთ მათგანს კი ორგანიზმი საკვები პროდუქტების სახით იღებს (ეგზოგენური ანტიოქსიდანტები).

ანტიოქსიდანტური სისტემა იყოფა ორ ძირითად რგოლად : 1. ფერმენტული (კატალაზა, სუპეროქისდ დისმუტაზა და გულტათიონ პეროქსიდაზა) და 2. არაფერმენტული ანტიოქსიდანტები (ასკორბინის მჟავა, უბიქინონი, ელემენტები Fe, Cu,

Zn, პოლიფენოლები, კაროტინოიდები და ა.შ. აღსანიშნავია, რომ ანტიოქსიდანტურ ნაერთებს შორის ყველაზე ეფექტურ დამცველობით ფუნქციებს ფერმენტული ანტიოქსიდანტები ასრულებენ. (4) (5)

ფერმენტული ანტიოქსიდანტები თავის მხრივ იყოფა ორ ჯგუფად: პირველად და მეორეულ ანტიოქსიდანტებად. პირველადი ანტიოქსიდანტებია :

1. სუპეროქსიდ დისმუტაზა (SOD) – სუპეროქსიდის რადიკალს გარდაქმნის წყალბადის ზეჟანგად. მათ კოფერმენტებს წარმოადგენს სპილენძი, მაგნიუმი, რკინა და თუთია.
2. კატალაზა (CAT) - შლის წყალბადის ზეჟანგს წყლის და ჟანგბადის მოლეკულად, რისთვისაც კოფაქტორებად იყენებს რკინასადა მაგნიუმს.
3. გლუტათიონ პეროქსიდაზა (GPx) – აკატალიზებს რეაქციას, რის შედეგადაც 2 მოლეკულა გულტათიონისა და წყალბადის ზეჟანგისგან, მიიღება გლუტათიონის დისულფიდი და წყალი.

მეორეული ანტიოქსიდანტებია: გლუტათიონ რედუქტაზა (GR) და გლუკოზო–6–ფოსფატ დეჰიდროგენაზა (G6PDH).

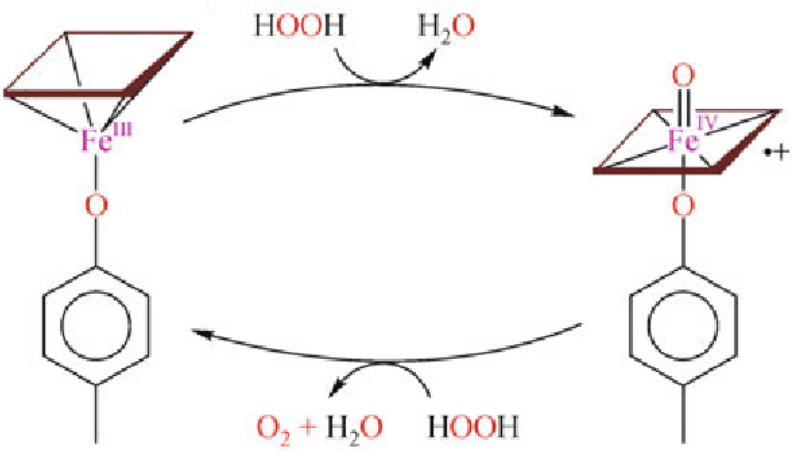
ეგზოგენური ანტიოქსიდანტების მიღება ძირითადად ხდება მცენარეული და მინერალებით მდიდარი საკვებიდან. მაშინ, როდესაც ორგანიზმში ბუნებრივად არსებული ანტიოქსიდანტები ვერ უმკლავდებიან თავისუფალ რადიკალებს, ამ დროს პროცესში ეგზოგენური ანტიოქსიდანტები გადამწვეტ როლს თამაშობენ. მათ ძირითად წყაროს წარმოადგენს ხილი, ბოსტნეული, ბურღულეული პარკოსნები, ღვინო, ყავა, ჩაი და ა.შ.

## კატალაზა

კატალაზა 1818 წელს იქნა აღმოჩენილი ლუის. ჯ. სენარდის მიერ, ხოლო სახელი დაერქვა 1900 წელს ოსკარ ლოუეს მიერ. მისი შესწავლა გასული საუკუნის შუა პერიოდიდან დღემდე ინტენსიურად მიმდინარეობს. დღესდღეობით ცნობილია, რომ კატალაზა ერთ–ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან ანტიოქსიდანტურ ფერმენტს წარმოადგენს. იგი გვხვდება თითქმის ყველა აერობულ ორგანიზმში (ცხოველები, მცენარეები, ბაქტერიები). კატალაზას მაკოდირებელი გენი -CAT ადამიანის მე–11 ქრომოსომაში არის ლოკალიზებული. აღმოჩენილია კატალაზას სამი ტიპი. მათ შორის ყველაზე

გავრცელებულია მონოფუნქციური ჰემის ჯგუფის შემცველი კატალაზა, რომელიც ყველა აერობულ ორგანიზმში გვხვდება. მეორე ტიპისაა ბიფუნქციური კატალაზა–პეროქსიდაზა, რომელიც იშვიათად გვხვდება ბუნებაში და ისიც წარმოდგენილია ჰემის ჯგუფით. ხოლო მესამე ტიპი შეიცავს მანგანუმს და ჰემის ჯგუფი არ გააჩნია. ადამიანებში წარმოდგენილია პირველი ტიპის კატალაზა და მისი მოლეკულური მასა დაახლ. 220–240 კდა არის. სტრუქტურულად წარმოადგენს ტეტრამერულ ცილას, რომელიც 4 პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან შედგება. ფერმენტის შემადგენლობაში გვხვდება 4 რკინის ატომი და ჰემის ჯგუფი. მის კოფაქტორებს წარმოადგენს ცვალებადი ვალენტობის მქონე რკინა (Fe), მანგანუმი (Mn) და NADPH. კატალაზას აქტივობისათვის pH ოპტიმუმია 7–დან 9მდე.

ცნობილია, რომ კატალაზას სუბსტრატს წარმოადგენს წყალბადის ზეჟანგი. წყალბადის ზეჟანგთან იგი ურთიერთქმედებს მის სტრუქტურაში შემავალი რკინის ატომის დახმარებით და სუბსტრატს შლის წყლად და მოლეკულურ ჟანგბადად. (6) (7) ეს რეაქცია ორ ეტაპად მიმდინარეობს :




1. $H_2O_2 + Fe^{+3} \rightarrow H_2O + O{=}Fe^{+4}$
2. $H_2O_2 + O{=}Fe^{+4} \rightarrow \mathbf{H_2O} + Fe^{+3} + \mathbf{O_2}$

ფერმენტის აქტიურ ცენტრთან დაკავშირებული წყალბადის ზეჟანგის ჟანგბადის ატომი რკინასთან ამყარებს კოვალენტურ ბმას და შედეგად გამოთავისუფლდება წყლის მოლეკულა. წარმოქმნილი $O{=}Fe^{+4}$ ნაერთი ურთიერთქმედებს მეორე წყალბადის ზეჟანგის მოლეკულასთან, რკინა აღიდგენს საწყის მდგომარეობას და გამოთავისუფლდება წყალი და მოლეკულური ჟანგბადი.

კატალაზას უჯრედი ძირითადად წყალბადის ზეჟანგის ნაკლებად საზიანო ნაერთებად გარდაქმნაში იყენებს. თაგვები, რომლებიც გენეტიკურად მოდიფიცირებულები არიან ისე, რომ კატალაზას სინთეზის უნარი დაკარგული ჰქონდეთ ფენოტიპურად ნორმალურები არიან მაგრამ, კატალაზას ნაკლებობა ზრდის ისეთი პათოლოგიების განვითარების ალბათობას როგორიცაა მე–2 ტიპის დიაბეტი, ღვიძლის დაზიანებები და ა.შ. კატალაზა ეუკარიოტულ უჯრედებში ლოკალიზებულია ძირითადად პეროქსისომებში და ზოგიერთ შემთხვევაში ციტოზოლშიც.

ცოცხალ ორგანიზმთა უმრავლესობაში კატალაზა ყველა ორგანოშია, მაგრამ განსაკუთრებით მაღალი რაოდენობითაა ღვიძლში.

კატალაზას ნაკლებობა ან ფუნქციის დარღვევები ისეთ დაავადებებთან არის დაკავშირებული, როგორიც არის დიაბეტი, ვიტილიგო, გულ–სისხლძარღვთა დარღვევები, ანემია, ალცჰაიმერის დაავადება, ბიპოლარული აშლილობა, შიზოფრენია და ა.შ. აკატალაზემია იშვიათი გენეტიკური აუტოსომურ რეცესიული დაავადებაა, რომელიც იწვევს კატალაზის დონის შემცირებას. ფერმენტი წამყვან როლს ასრულებს უჯრედში წყალბადის ზეჟანგის დონის რეგულირებაში. მაგ. იგი იცავს პანკრეასულ ბეტა უჯრედებს წყალბადის ზეჟანგის დამაზიანებელი გავლენისაგან.

დღესდღეობით კატალაზას აქტივობის განსაზღვრის რამდენიმე მეთოდი არსებობს. 1870 წელს მეცნიერმა შოენმა აღმოჩინა, რომ წყალბადის ზეჟანგი მოლიბდატთან რეაქციაში იძლევა ყვითელ შეფერილობას. ამ რეაქციაზე დაყრდნობით მეოცე საუკუნის შუა პერიოდში დაიწყეს კატალაზის აქტივობის შესწავლა კოლორიმეტრული მეთოდის გამოყენებით. გარდა კლასიკური მეთოდისა ხშირად გამოიყენება პირდაპირი UV დასხივების მეთოდი კატალაზის მოქმედებით დინამიკაში წყალბადის ზეჟანგის კონცენტრაციის შემცირების პროცესზე დასაკვირვებლად.

## ფლავონოიდები როგორც ანტიოქსიდანტები

ფლავონოიდები მცენარის მეორადი მეტაბოლიტები არიან და გააჩნიათ პონიფენოლური სტრუქტურა. ყველა მათგანის საწყის კომპონენტს ფელინალანინის მოლეკულა წარმოადგენს. სტრუქტურის მიხედვით გამოიყოფა 4 ძირითადი ჯგუფი,

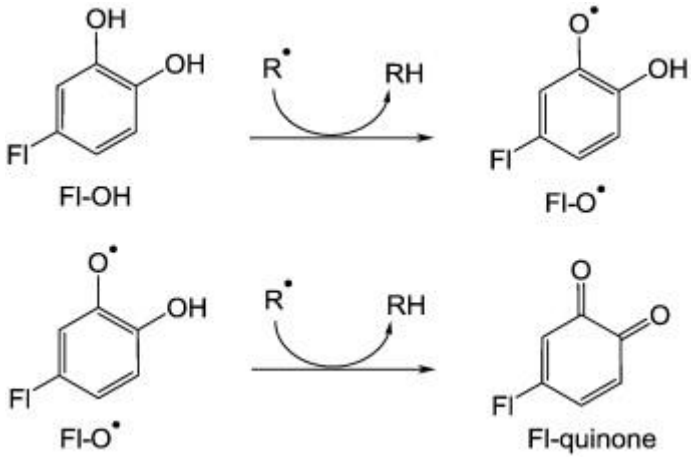
ესენია : ფლავონოლები, ფლავონები, იზოფლავონები და ანტოციანინები. ყველა მათგანს გააჩნია განსხვავებული ბიოლოგიური ფუნქცია და აქტივობა. მაგ. ზოგიერთი მათგანი მონაწილეობს მცენარეებისა და ხილის პიგმენტაცაში, მცენარეების დაცვაში პათოგენებისაგან და ა.შ. გარდა ამისა მცენარეებში ფლავონოიდები მოისაზრებიან როგორც ჟანგბადის აქტიური ფორმებისგან დამცავი მეორეული სისტემა. (8) (9)

ფლავონოიდები წარმოადგენენ ადამიანის მიერ მოხმარებულ საკვებში შემავალ მნიშვნელოვან კომპონენტს. დიეტასთან დაკავშირებული ანომალია, რომელსაც სხვაგვარად ფრანგული პარადოქსი ეწოდება, პირველად აღმოჩენილი იქნა საფრანგეთის პოპულაციაში და მოგვიანებით შესწავლილი იქნა ხმელთაშუა ზღვისპირეთის ქვეყნების მაცხოვრებლებშიც. ეპიდემიოლოგიურმა კვლევებმა აჩვენეს, რომ ფლავონოიდით მდიდარი საკვები კორელაციაში იყო სიცოცხლის ხანგრძლივობასა და გულსისხლძართვა დაავადებების ნაკლებობასთან, მიუხედავად ამ მოსახელობის საკვებ რაციონში ცხიმების მაღალი შემცველობისა. გარდა მათი ანტიოქსიდანტური თვისებებისა, ფლავონოიდებს აღმოაჩნდათ ანტივირუსული, ანტიბაქტერიული, ანთების საწინააღმდეგო, ანტი კარცეროგენული თვისებები. გარდა ამისა ისინი ხელს უშლიან ლიპიდების ზეჟანგურ ჟანგვასა და თრომბოციტების აგრეგაციას. მიუხედავად მათი ამ უამრავი სასარგებლო თვისებისა, მეცნიერების ყურადღებას დღესდღეობით განსაკუთრებით იპყრობს ამ ნაერთების ანტიოქსიდანტური თვისებები. ფლავონოიდების ანტიოქსიდანტური აქტივობა გამოიხატება მათი უნარით გააუვნებელყონ თავისუფალი რადიკალები და შეამცირონ მათი  დამაზიანებელი მოქმედება ორგანიზმებზე. ფლავონოიდები ამ პროცესს ახორციელებენ რამდენიმე მექანიზმით. ესენია :

- ჟანგბადის აქტიური ფორმების პირდაპირ გაუვნებელყოფა
- ოქსიდაზური ფერმენტების აქტივობის ინჰიბირება
- ანტიოქსიდანტური ფერმენტების გააქტიურება
- შარდის მჟავას კონცენტრაციის მომატება
- აზოტის ოქსიდით გამოწვეული ჟანგვითი სტრესის დათრგუნვა
- დაბალმოლეკულური ანტიოქსიდანტების ანტიოქსიდანტური თვისებების ამაღლება

ფლავონოიდების ანტიოქსიდანტური აქტივობა In vitro დამოკიდებულია მათ ფუნქციურ ჯგუფზე. მოქმედების მექანიზმს განაპირობებს ჰიდროქსილის ჯგუფების რაოდენობა და კონფიგურაცია. ROS გაუვნებელყოფაში გადამწყვეტ როლს ასრულებს B

რგოლი. რაც შეეხება A და C რგოლებს, მათი ჩანაცვლება პეროქსიდის ანიონის გაუვნებელყოფაზე დიდ გავლენას არ ახდენს. ანტიქოსიდანტების აქტიურობა In vitro შესაძლებელია ფლავონოიდის მონომერების პოლიმერიზაციით, მაგ. პროანთოციანიდინები, კატექინის პოლიმერები, წარმოადგენენ კარგ ანტიოქსიდანტებს ვინაიდან ჰიდროქსილის ჯგუფებს დიდი რაოდენობით შეიცავენ. ფლავონოიდების თავისუფალ რადიკალებზე ზემოქმედების კონკრეტული შემთხვევა გამოხატულია შემდეგ სქემაზე :




სადაც Fl-OH წარმოადგენს ფლავონოიდის მოლეკულას, R• არის თავისუფალი რადიკალი. ხოლო Fl-O• წარმოადგენს ფლავონოიდის ფენოქსილის რადიკალს, რომელსაც შემდგომ უკავშირდება მეორე რადიკალი და წარმოიქმნება სტაბილური ქინონის სტრუქტურის მქონე მოლეკულა.

აღსანიშნავია ისიც, რომ კვლევების თანახმად ფლავონოიდებს არ გააჩნიათ მხოლოდ ანტიოქსიდანტური თვისებები, არამედ პირიქით ზოგიერთ შემთხვევაში შესაძლოა მათ ხელი შეუწყონ სხვა ნაერთების დაჟანგვას. არსებობს კვლევები იმის შესახებ, რომ ფლავონოიდების პროოქსიდანტური თვისებები მათ კონცენტრაციაზეა დამოკიდებული. მიუხედავად ამისა, არ შეიძლება ფლავონოიდების პროოქსიდანტური თვისებები ცალმხრივად ტოქსიკურ თვისებად წარმოვიდგინოთ.

## კვლევის ობიექტი

კვლევისათვის შერჩეული იყო 20 ზრდასრული ლაბორატორიული ვირთაგვა (მამრი), რომელიც დაიყო 4 ძირითად საკვლევ ჯგუფად :

1. კონტროლი – ინექციის გარეშე
2. კონტროლი–სპირტი – სპირტხსნარიანი ინექცია
3. საკვლევი ჯგუფი 1 – ფლავონოიდის ინექცია
4. საკვლევი ჯგუფი 2 – ქვერცეტინის ინექცია

ვირთაგვებს 5 დღის განმავლობაში, ყოველ 24 საათში ერთხელ, ერთ დროს (13:00–14:00) უკეთდებოდათ უცვლელი კონცენტრაციით ინექცია. (საბოლოო კონცენტრაცია 20 მგ/კგ–ზე)

- ჯგუფი 2 – კუნთში შეყვანილი იქნა 100 მკლ 96% ეთანოლი.
- ჯგუფი 3 – 25 მგ/მლ კონცენტრაციის 100 მკლ საფერავიდან მიღებული ფლავონოდების ფრაქციის შემცველი სპირტხსნარი
- ჯგუფი 4 – 25 მგ/მლ კონცენტრაციის 100 მკლ ქვერცეტინის შემცველი სპირტხსნარი.

ბოლო დღეს, საბოლოო ინექციიდან 2 სთ–ის შემდეგ მოხდა ვირთაგვების დეკაპიტაცია და ქსოვილების აღება. პერფუზიისთვის გამოყენებული იქნა ცივი KCl ის 1.15%–იანი ხსნარი. აღებული ნიმუშები შენახული იყო –25˚C

## გამოყენებული მეთოდები

### ჰომოგენიზაცია და სუპერნატანტის ნიმუშის აღება

ჰომოგენიზაცია წარმოადგენს პროცესს, რომლის დროსაც ცალკეული ქსოვილებიდან, მათი დაქუცმაცების და სტრუქტურის დარღვევის შედეგად ერთგვაროვანი მასა მიიღება. მნიშვნელოვანია, რომ ეს პროცესი ისეთ პირობებში იქნას

ჩატარებული, რომ მისაღებ უჯრედებს, ორგანელებს ან მოლეკულებს შენარჩუნებული ჰქონდეთ ფიზიკური და ქიმიური თვისებები. ჰომოგენიზაციის პროცესი მიმდინარეობს წყალხსნარებში. ყურადღება უნდა მიექცეს pH-ის მნიშვნელობას, ოსმოსურ წნევისა და ტემპერატურის მაჩვენებლებს. გამოყოფის პროცესი უნდა მიმდინარეობდეს 0–4 ˚C ტემპერატურაზე ცივ ოთახში ან ყინულზე ვინაიდან ოთახის ტემპერატურაზე მოლეკულები ზემოქმედებას განიცდიან ჰიდროლიზური ფერმენტებით, პროტეაზებითა და ნუკლეაზებით და თავიანთ ფიზიკო–ქიმიურ თვისებებს კარგავენ. არსებობს ჰომოგენიზაციის რამდენიმე გზა, ესენია : ქიმიური ჰომოგენიზაცია, მექანიკური ჰომოგენიზაცია, ულტრასონიკატორით ჰომოგენიზაცია და ა.შ. ექსტრაქციისათვის ძირითადად გამოიყენება ბუფერები ან 0.25M საქაროზას იზოოსმოსური ხსნარი. ბუფერის ტიპი ძირითადად დამოკიდებულია გამოსაყოფი ობიექტის თვისებებზე. (10)

საკვლევი მოლეკულების მისაღებად პირველ რიგში საჭიროა მოხდეს უჯრედების სტრუქტურის დარღვევა. ჰომოგენიზატორის შერჩევა ხდება ასევე დასამუშავებელი ობიექტის მიხედვით.

ჰომოგენიზაციის პროცესი ჩვენს შემთხვევაში მოიცავდა შემდეგ საფეხურებს:

1. ავწონეთ 0.5 გ ღვიძლი და ტვინი და ყინულიან აბაზანაზე დავაქუცმაცეთ დანით მცირე ზომის ნაწილებად.
2. წინასწარ დამზადებული 0,5% ტრიტონიანი Tris ბუფერი 1 მლ ოდენობით ჩამოვასხით ეპენდორფებში, სადაც წინასწარ გვქონდა მოთავსებული მექანიკური ჰომოგენიზაციის ბურთულები (8ც)
3. ეპენდორფებში შევიტანეთ ღვიძლისა და ტვინის ფრაქციები და ეპენდორფები შევავსეთ 1.5 მლ–მდე ისევ ტრიტონიანი Tris ბუფერით.
4. ეპენდორფები მოვათავსეთ ვორტექსში სადაც მოხდა მათი ნჯღრევა 5 წუთის განმავლობაში.
5. ეპენდორფები გადავიტანეთ სონიკატორში, სადაც მოხდა ნიმუშების დამატებითი ჰომოგენიზაცია ულტრაბგერითი მოქმედების საფუძველზე 5 წუთის განმავლობაში
6. მოხდა ისევ მათი დანჯღრევა ვორტექსზე 10 წმ–ის განმავლობაში
7. დავაცენტრიფუგირეთ 10 000 ბრუნზე 5 წუთის განმავლობაში

8. ცენტრიფუგირების შემდგომ 500 მლ სუპერნატანტი გადმოვიტანეთ ახალ ეპენდორფებში და განვაზავეთ 2–ჯერ Tris HCl- ით (pH=7.6)
9. დავამზადეთ ალიკვოტები და შევყინეთ –20 ˚C–ზე.

## სპექტროფოტომეტრია

სპექტროფოტომეტრია წარმოადგენს ელექტრომაგნიტური სპექტროსკოპიის განხრას, რომელიც იყენებს ფოტომეტრს სინათლის შთანთქმის გასაზომად სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე. ორგანული ნაერთების მიერ 100–800 ნმ ტალღის სიგრძის გამოსხივების შთანთქმისას ხდება ელექტრონების აღგზნება. ერთი და იგივე ნივთიერება განსხვავებული ტალღის სიგრძის სინათლებს არათანაბრად შთანთქავს. შთანთქმის სპექტრი წარმოადგენს მრუდს, რომელიც გვიჩვენებს დამოკიდებულებას შთანთქმასა და ტალღის სიგრძეს შორის. ეს მრუდი არის უწყვეტი და მაქსიმალურია იმ უბნებში სადაც მოლეკულის მიერ ქვანტების შთანთქმა მაქსიმალურია. შთანთქმის სპექტრი ორ ძირითად ჯგუფად იყოფა:

1. ულტრაიისფერი უბნების სპექტრი – 100–400ნმ
2. ხილული უბნების სპექტრი – 400–800 ნმ, აღნიშნულ ტალღის უბანში შთანთქმა აღქმადია ადამიანის თვალის მიერ

შთანთქმის სპექტრის შესწავლა იძლევა საშუალებას გავიგოთ თუ რომელი ნივთიერება განაპირობებს შთანთქმას ამა თუ იმ ფოტობიოლოგიურ პორცესებში. შთანთქმის სპექტრის აღქმა სპექტროფოტომეტრის აპარატის საშუალებით ხდება. სინათლის წყაროდან გამომავალი სინათლე ხვდება მონოქრომატორში, რომელიც კონკრეტული ტალღის სიგრძის გამოსხივებას იძლევა. აქედან კი სინათლე ეცემა ნიმუშს. ნიმუშიდან გამოსული შესუსტებული სინათლის ნაკადი გადაეცემა ფოტოელექტროგამაძლიერებელს, სადაც ხდება ქვანტის ენერგიის გარდაქმნა ელექტრულ ენერგიად. ელექტრული იმპულსების გადაცემა კი ხდება მარეგისტრირებელ ხელსაწყოსთან და მონაცემები აითვლება გალვანომეტრზე ან ჩაიწერება თვითჩამწერზე. აპარატში თავსდება ორი კიუვეტა. აქედან ერთ კიუვეტაში გვაქვს სუფთა გამხსნელი, ხოლო მეორეში ამავე გამხსნელში გახსნილი საკვლევი ნივთიერება. (10)

გამოსხივების ინტენსივობის აღწერა ხდება ლამბერტ–ბუგერბერის კანონით. შთანთქმის სპექტრი გრაფიკია, რომელიც გვიჩვენებს ურთიერთდამოკიდებულებას ოპტიკურ სიმკვრივესა და ტალღის სიგრძეს შორის.

## ცილის კონცენტრაციის გაზომვა ლოურის მეთოდით

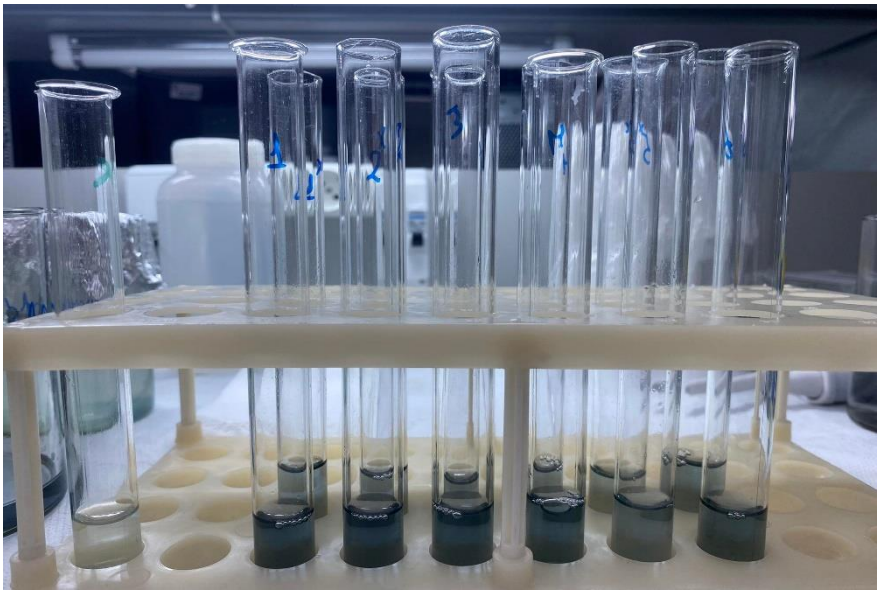
ცილის კონცეტრაციის განსაზღვრის მეთოდებს შორის ყველაზე მგრძნობიარე და ზუსტ მეთოდს წარმოადგენს ლოურის მეთოდი, რომელიც აერთიანებს ბიურეტისა და ფოლინის რეაქციებს. ფოლინის რეაქტივთან ცილის მოლეკულის შემადგენლობაში არსებული ამინომჟავები (თიროზინი და ცისტეინი) წარმოქმნიან ლურჯ შეფერილობას. ფერი წარმოიქმნება ფოლინის აღდგენის შედეგად. (11)

საჭირო რეაქტივები :

- A რეაქტივი – $Na_2CO_3$ (უწყლო) 2% ხსნარი, დამზადებული 0.1 N NaOH–ზე
- B რეაქტივი – 0.5%–იანი $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ დამზადებული 1% ნატრიუმის ციტრატის ხსნარზე
- C რეაქტივი – B:A=1:50 მზადდება ცდის წინ
- ფოლინის რეაქტივი

ცდის მსვლელობა :

1. სინჯარებში ჩამოვასხით 2.5 ml C რეაქტივი
2. თითოეულ სინჯარაში ჩავამატეთ 5 მკლ ტვინისა და ღვიძლის ჰომოგენატები
3. დავავორტექსეთ და ოთახის ტემპერატურაზე დავტოვეთ ინკუბაციაზე 10 წუთის განმავლობაში.
4. ნიმუშებს დავამატეთ 200 მკლ ფოლინი. და ხელახლა დავავორტექსეთ.
5. დავაყოვნეთ 25–30 წთ განმავლობაში
6. ნიმუშების გაზომვა მოხდა სპექტროფოტომეტრში 750 ნმ ტალღის სიგრძეზე.
7. კონტროლად ავიღეთ იგივე მოცულობის რეაქტივები სადაც ნიმუშის მაგივრად დამატებული გვქონდა წყალი



ცილის კონცენტრაცია იზომება საკალიბრო მრუდის გამოყენებით. საკალიბრო მრუდის ასაგებად სტანდარტულად გამოიყენება ადამიანის ან ხარის ალბუმინი. ჩვენს შემთხვევაში გამოყენებული იქნა ხარის ალბუმინი.

| კონც. საკალიბრო მრუდისთვის mg/ml |
|---|
| 3.1 |
| 1.5 |
| 0.7 |
| 0.3 |
| 0.1 |

## ფერმენტ კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა ვირთაგვის ღვიძლისა და ტვინის ჰომოგენატებში კლასიკური მეთოდით

ფერმენტი კატალაზას აქტივობის განსასაზღვრად სპექტროფოტომეტრიის მეთოდი ყველაზე ხშირად გამოიყენება. ამ მეთოდის პრინციპს წარმოადგენს ის, რომ წყალბადის ზეჟანგი მოლიბდენის მარილებთან ურთიერთქმედებისას წარმოქმნის ჩალისფერ

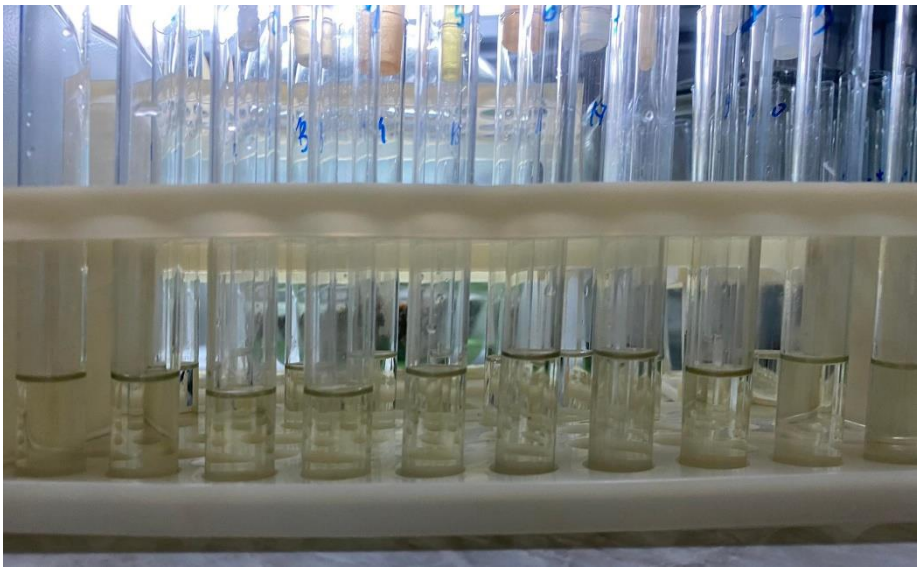
კომპლექსს. ფერმენტი კატალაზა კი, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, უზრუნველყოფს წყალბადის ზეჟანგის დაშლას წყლად და მოლეკულურ ჟანგბადად. (12)

| K | $A_x$ | St | ნიმუში |
|---|---|---|---|
| 3 მლ $dH_2O$ | 100 მკლ $dH_2O$<br>2 მლ $H_2O_2$ | 2.1 მლ $dH_2O$ | 100 მკლ ღვიძლის/ტვინის ჰომოგენატი<br>2 მლ $H_2O_2$ |

| 10 წუთიანი ინკუბაცია ოთახის ტემპერატურაზე |
|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| | + 1 მლ (4)% მოლიბდატი | + 1 მლ (4)% მოლიბდატი | + 1 მლ (4)% მოლიბდატი |

შთანთქმები გაზომილი იქნა სპექტროფოტომეტრის საშუალებით 410 ნმ ტალღის სიგრძეზე.



ფერმენტ კატალაზას აქტივობა გამოითვლება ფორმულით :

$$C=\frac{E}{0.01598}\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{Prot.Concentration}$$ (μM $H_2O_2$/mg prot/min)

სადაც C არის – ფერმენტის აქტივობა. E – არის სხვაობა Ax და A ცდებს შორის

## ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენება ფერემენტი კატალაზას აქტივობის შესაფასებლად

თავისუფალი რადიკალების შესწავლის არაერთი მეთოდი არსებობს, რომელთა შორის ყველაზე ხშირად გამოიყენება ელექტრო პარამაგნიტურრეზონანსის მეთოდი, რომელიც დიდ დროსა და ხარჯებს მოითხოვს. რადიკალის ფიქსაციისთვის გამოიყენება თხვადი აზოტი. გარდა ამისა ამ მეთოდით შესაძლებელია კონკრეტული რადიკალების არსებობის აღმოჩენა და სარეაქციო არეში მათი კონცენტრაციის განსაზღვრა.

გაცილებით მარტივი და ნაკლებდანახარჯიანი მეთოდია ლუმინოლის ქემილუმინესცენცია, რომელიც საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ რადიკალების წარმოქმნის პროცესი დინამიკაში. ამ მეთოდის მსვლელობას არ სჭრიდება განსაკუთრებული პირობები. ქემილუმინესცენცია არის სხეულთა ლუმინესცენცია (ნათება), რომელიც გამოწვეულია ქიმიური ზემოქმედებით. ლუმინოლი იგივე 5–ამინო–2,3–დიჰიდროფტალაზინ–1,4–დიონი, წარმოადგენს ქიმიურ აგენტს, რომელიც ურთიერთქმედებს ჟანგბადის აქტიურ ფორმებთან და იძლევა ნათებას. ის არის ღია ყვითელი შეფერილობის და კარგად იხსნება ორგანულ გამხსნელებში.

ხშირად კრიმინალურ ექსპერტიზაში ლუმინოლს იყენებენ სისხლის აღმოსაჩენად, ვინაიდან იგი ურთიერთქმედებს სისხლის ჰემოგლობინში არსებულ რკინასთან. ბიოლოგიაში იგი გამოიყენება რკინის, სპილენძის იონებისა და სპეციფიკური პროტეინების აღმოსაჩენად ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდში. ჩვენს შემთხვევაში ლუმინოლი უკავშირდებოდა წყალბადის ზეჟანგის დაშლის შედეგად წარმოქმნილ ჟანგბადის აქტივირებულ ფორმებთან. წყალბადის ზეჟანგის დამშლელად ცდებში ძირითადად გამოიყენება სისხლის წითელი მარილი.

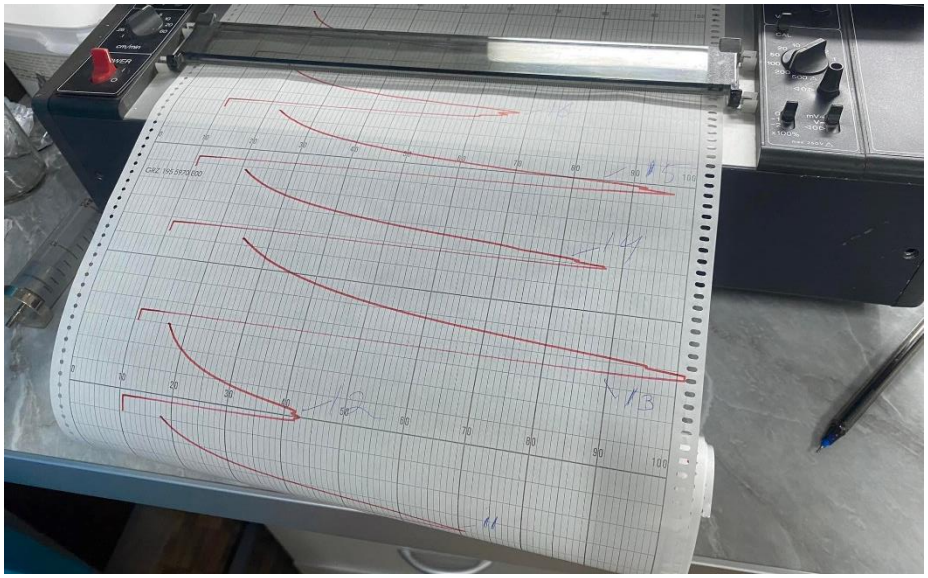
მეთოდის მსვლელობა :

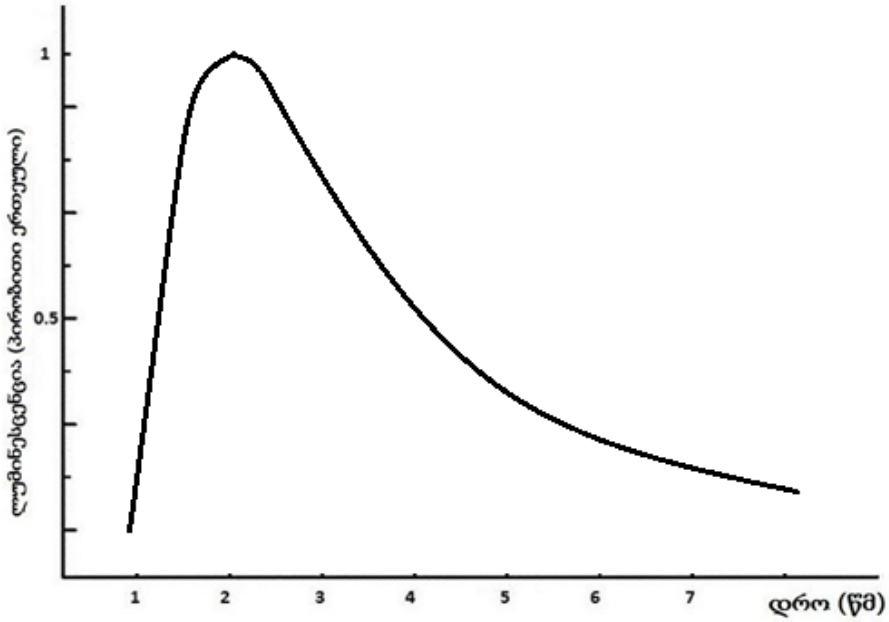
1. საინკუბაციო არეში, რომელიც შედგება 4 მლ ნატრიბორიუმის ბუფერისგან (0.01M, pH= 9,18), დავუმატეთ 50 µl საცდელი ღვიძლის/ტვინის ჰომოგენატი (სისხლის წითელი მარილის ნაცვლად) და 50 µl 0,05% ლუმინოლის ხსნარი.
2. ნიმუშები შეგვქონდა ლუმინომეტრის ფოტოელექტროგამამრავლებელში სადაც ვუმატებდით 200 µl წყალბადის ზეჟანგს, რაც იწვევდა ქემილუმინესცენციას.
3. ნათება აღირიცხებოდა თვითმწერზე ინდუქციური მრუდის სახით

ნათება გამოიწვია იმან, რომ ჰომოგენატის მოქმედებით წყალბადის ზეჟანგი დაიშალა ჟანგბადის გააქტიურებული ფორმებად, თავისუფალ რადიკალებად, რომლებიც დაუკავშირდა არეში არსებულ ლუმინოლს. ნათება მით უფრო ინტენსიურია, რაც უფრო მაღალი ინტენსივობით მიმდინარეობს ნიმუშში თავისუფალ რადიკალური ჟანგვითი პროცესები. ვინაიდან ფერმენტ კატალაზას აქვს წყალბადის ზეჟანგის სტაბილურ მოლეკულებად დაშლის უნარი, სავარაუდო იქნებოდა, რომ ნათება ნორმალურ პირობებში უკუპროპორციული იქნებოდა კატალაზას აქტივობისა.

თვითმწერზე რომელთანაც ლუმინომეტრი იყო დაკავშირებული პარამეტრები იყო შემდეგნაირი :

- თვითმწერი 100 MV (მილი ვოლტი)
- ფოტოელემენტზე მინიჭებული ძაბვა 0,6 KV (კილოვატი)
- ლენტის სიჩქარე 5 სმ/წთ



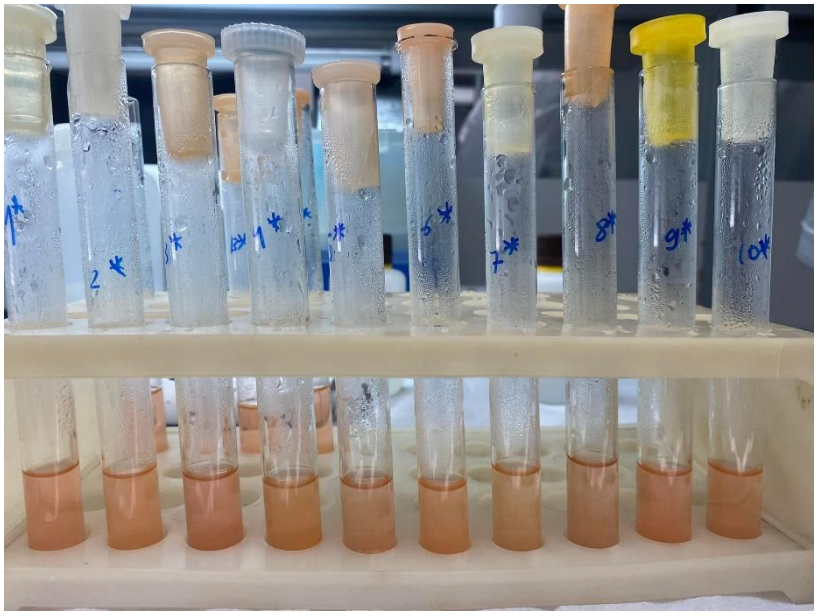



## მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაციის განსაზღვრა ვირთაგვას ღვიძლისა და თავის ტვინის ჰომოგენატებში

მეთოდის საფუძველს წარმოადგენს თიობარბიტურატის მჟავის ურთიერთქმედება მალონილ დეალდეჰიდთან, რომელიც წარმოადგენს ლიპიდების პათოლოგიური ზეჟანგური ჟანგვის ერთ–ერთ საბოლოო პროდუქტს. ამ ურთიერთქმედების შედეგად მიიღება სტაფილოსფრად შეღებილი ტრიმეთინური კომპლექსი.

მეთოდის მსვლელობა :

1. ცენტრიფუგის სინჯარებში შეტანილი გვქონდა 2მლ ოდენობით Tris HCl (pH=7,4) რომელსაც დავუმატეთ 1 მლ 17%–იანი ტრიქლორძმარმჟავა. (ნივთიერება რომელიც აჩერებს ჟანგვით პროცესებს)
2. სინჯარებში შევიტანეთ 300 µl ღვიძლი/თავის ტვინის ნიმუშები
3. დავაცენტრიფუგირეთ 6000ბრ 10 წუთის განმავლობაში
4. მიღებული სუპერნატანტი 2მლ ოდენობით გადავიტანეთ სინჯარებში სადაც წინასწარ გვქონდა დამატენბული 1 მლ 0,8%–იანი თიობარბიტურატის მჟავა.
5. ნარევი გავაცხელეთ წყლის დუღილის ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში
6. ნიმუშებმა მიიღეს მკვეთრი სტაფილოსფერი შეფერილობა, რომელიც გავზომეთ სპექტროფოტომეტრის აპარატში 532 ნმ ტალღის სიგრძეზე



მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაციის გამოთვლა ხდება ფორმულით :

$$k = \frac{A0 - Ak}{\varepsilon}$$

სადაც k – არის ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტი. $A_0$ საცდელი ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე. $A_x$ საკონტროლო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე. ε – ექსტენციის მოლარული კოეფიციენტი, რომელიც მოცემულ შემთხვევაში უდრის $1.56 \times 10^5$

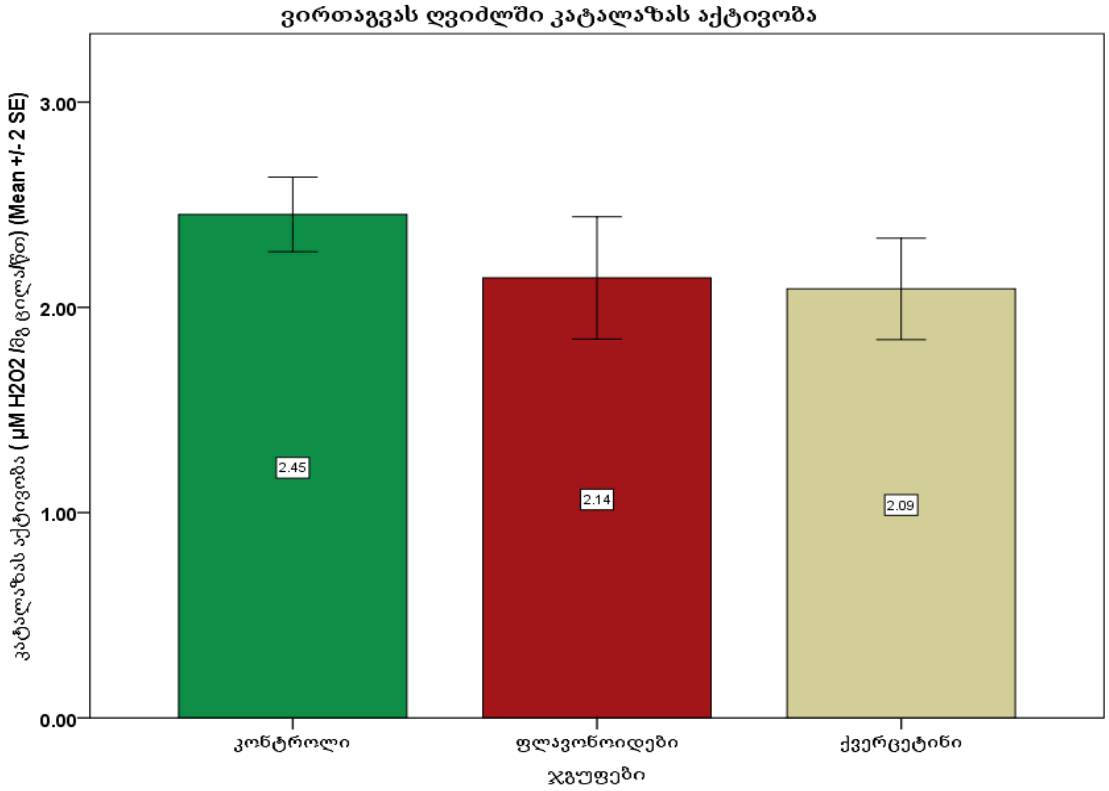
## კვლევის შედეგების სტატისტიკური დამუშავება

კვლევის შედეგების სტატისტიკურმა ანალიზმა ერთფაქტორიანი დისპერსიული ანალიზის (One-Way ANOVA) გამოყენებით გამოავლინა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება საკვლევ ჯგუფებს შორის ღვიძლში მალონდეალდეჰიდის (MDA) კონცენტრაციაში ($F(2,19)=13.314$, $P<0.05$). ანალიზის შემდგომმა Post Hoc ტესტმა (Tukey ტესტი) მოგვცა საშუალება გამოგვევლინა ერთმანეთისაგან განსხვავებული კონკრეტული წყვილები. კერძოდ, დადგინდა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება საკონტროლო ჯგუფსა და ფლავონოიდების ჯგუფს, ასევე ფლავონოიდების ჯგუფსა და ქვერცეტინის ჯგუფს შორის. ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა ვირთაგვების თავის ტვინში MDA კონცენტრაციაში ($F(2,19)=2.245$, $P>0.05$). სტატისტიკურმა ანალიზმა ასევე არ გამოავლინა საკვლევ ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო

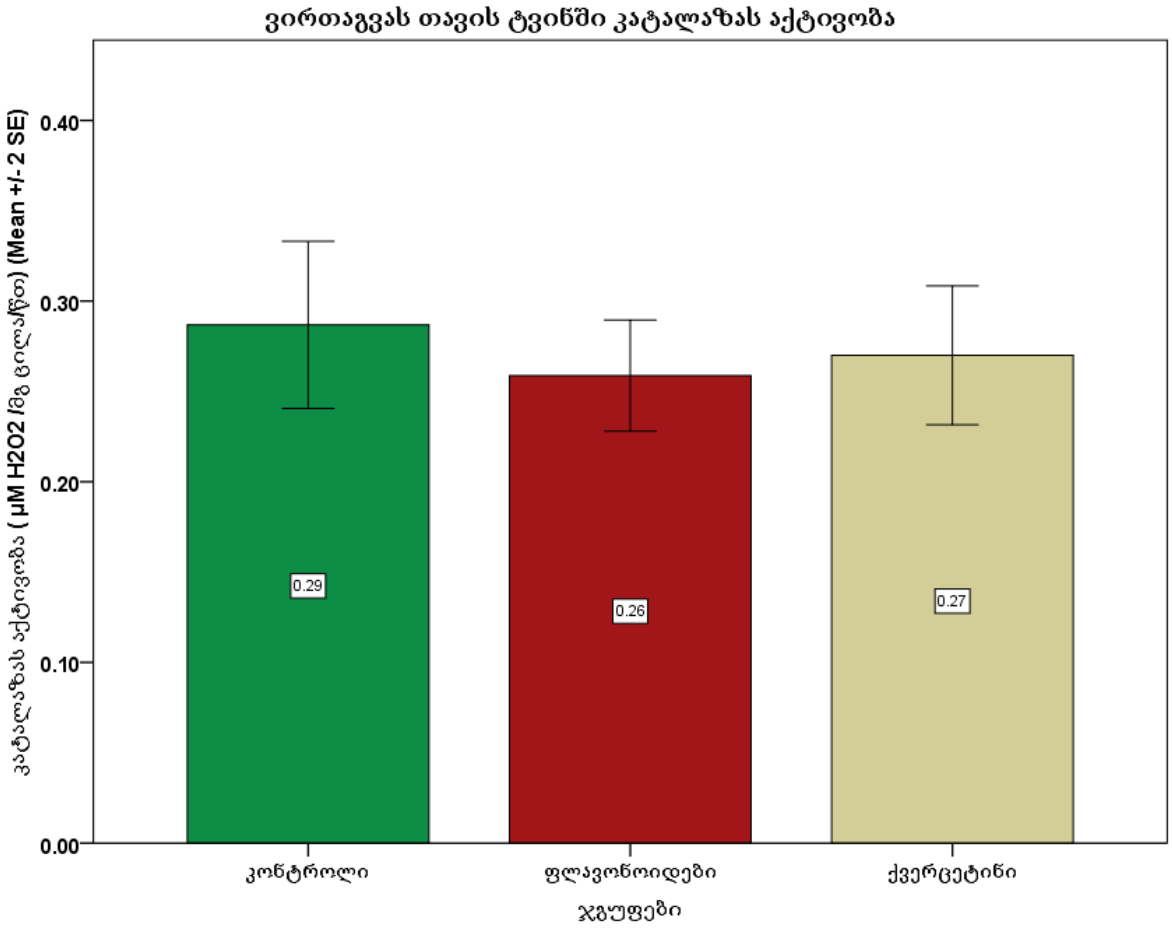
განსხვავება კატალაზას აქტივობაში, როგორც ღვიძლში (F(2,19)=2.257, P>0.05), , ისე თავის ტვინში (F(2,19)=.523, P>0.05).

რაც შეეხება წყალბადის ზეჟანგით ინდუცირებულ ლუმინოლის ქემოლუმინესცენციას, კვლევის შედეგების სტატისტიკურმა ანალიზმა გამოავლინა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება საკვლევ ჯგუფებს შორის როგორც ღვიძლში (F(2,19)=32.674, P<0.05), ისე თავის ტვინში (F(2,19)=11.830, P<0.05), ხოლო ანალიზის შემდგომმა Post Hoc ტესტმა (Tukey ტესტი) გამოავლინა ერთმანეთისაგან განსხვავებული კონკრეტული წყვილები. კერძოდ, კვლევის შედეგების თანახმად, საკონტროლო ჯგუფი სტატისტიკურად სარწმუნოდ (P<0.05) განსხვავდება როგორც ფლავონოიდების, ისე ქვერცეტინის ჯგუფისაგან.

## მიღებული შედეგები და მათი განხილვა




სურ #1. ფერმენტ კატალაზას ფარდობითი აქტივობა ვირთაგვას ღვიძლში 5 დღიანი ინექციის შემდგომ. (I - კონტროლი ) ინტაქტურ საკონტროლო ჯგუფში კატალაზას აქტივობა. (II – ფლავონოიდები) – ფლავონოიდური ფრაქციის სპირტხსნარით, კონც. 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული კატალაზას აქტივობა. (III – ქვერცეტინი) ქვერცეტინიანი სპირტხსნარით, საბოლოო კონცენტრაციით 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული კატალაზას აქტივობა.



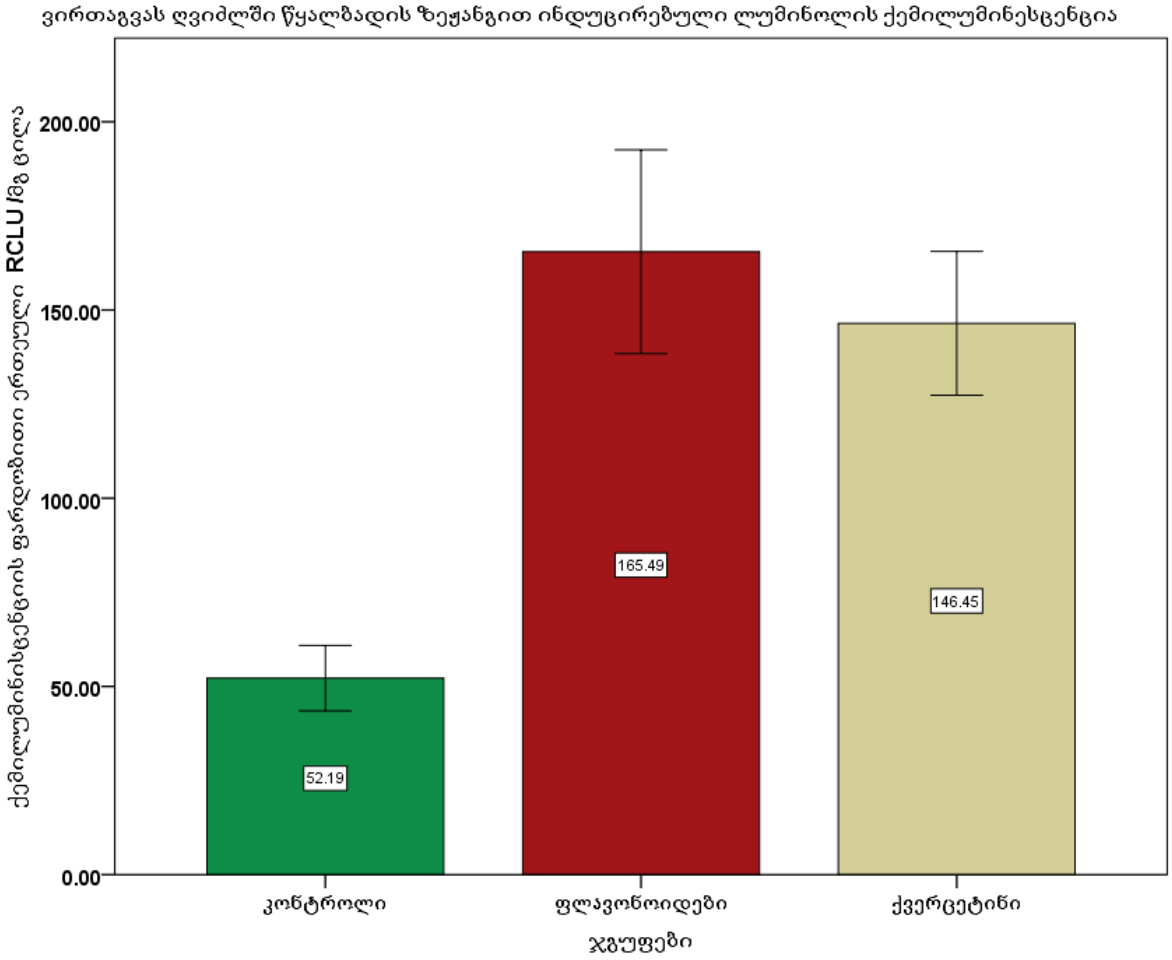

სურ #2. ფერმენტ კატალაზას ფარდობითი აქტივობა ვირთაგვას თავის ტვინში 5 დღიანი ინექციის შემდგომ. (I - კონტროლი) ინტაქტურ საკონტროლო ჯგუფში კატალაზას აქტივობა. (II - ფლავონოიდები) – ფლავონოიდური ფრაქციის სპირტხსნარით, კონც. 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული კატალაზას აქტივობა. (III – ქვერცეტინი) ქვერცეტინიანი სპირტხსნარით, საბოლოო კონცენტრაციით 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული კატალაზას აქტივობა.

კვლევის საწყის ეტაპზე მოხდა საკვლევი ჯგუფებიდან გამოყოფილი თავისა და ტვინის ნიმუშებში ფერმენტ კატალაზას აქტივობის სტანდარტული სპექტროსკოპიული მეთოდის გამოყენებით. ჩატარებული კვლევის შედეგები ნაჩვენებია სურათ 1 და 2–ზე.

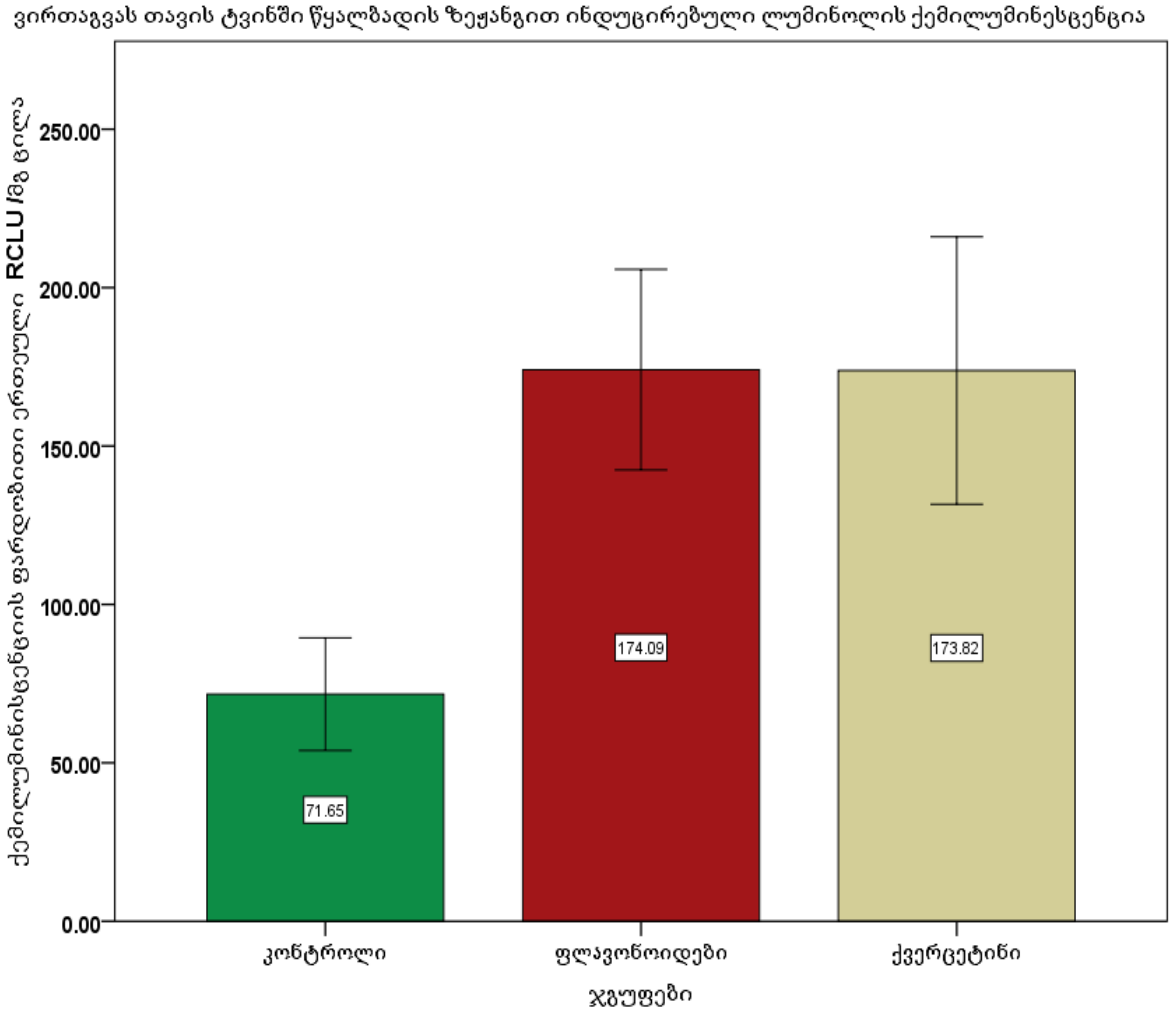
როგორც სურათი 1–დან ჩანს, კლასიკური მეთოდით ფერმენტი კატალაზას აქტივობის შესწავლისას ვირთაგვას ღვიძლში სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილება არ შეინიშნება, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ვირთაგვებში ფლავონოიდების 5 დღიანმა

ინექციამ კონცენტრაციით 20 მგ/კგ, ზემოქმედება არ განახორციელა ფერმენტ კატალაზას აქტივობაზე საცდელ ვირთაგვებში კონტროლთან შედარებით. ანალოგიური ტენდენცია აღინიშნებოდა თავის ტვინთან მიმართებით (სურათი 2)

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, გადავწყვიტეთ ფერმენტ კატალაზას აქტივობის შესწავლა ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით, რომელიც სპექტროსკოპიულ მეთოდთან შედარებით ბევრად მგრძნობიარედ ითვლება. ზემოთხსენებული მეთოდის გამოყენებით სამივე საკვლევ ჯგუფში მოვახდინეთ კატალაზას აქტივობაზე დაკვირვება წყალბადის ზეჟანგით ინიცირებული ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდით. შედეგები მოცემულია სურათ 3–ზე და სურათ 4–ზე.




სურ #3. წყალბადის ზეჟანგით ინდუცირებული ქემილუმინესცენციის შედეგები ვირთაგვას ღვიძლში 5 დღიანი ინექციის შემდგომ. (I – კონტროლი) ინტაქტურ საკონტროლო ჯგუფში ქემილუმინესცენციის ფარდობითი ინტენსივობა. (II – ფლავონოიდები) ფლავონოიდური ფრაქციის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული ქემილუმინესცენციის ფარდობითი ინტენსივობა. (III – ქვერცეტინი) ქვერცეტინის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული ქემილუმინესცენციის ფარდობითი ინტენსივობა.



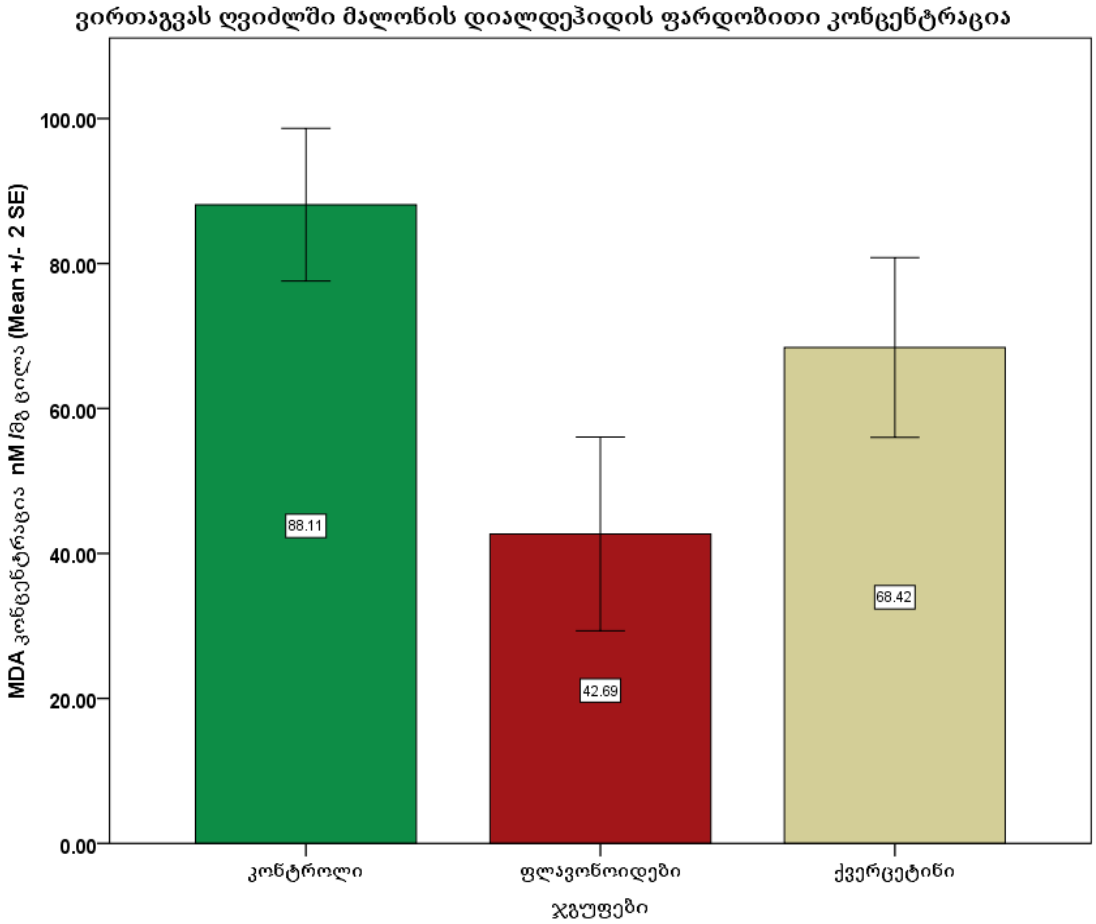

სურ #4. წყალბადის ზეჟანგით ინდუცირებული ქემილუმინესცენციის შედეგები ვირთაგვას თავის ტვინში 5 დღიანი ინექციის შემდგომ. (I – კონტროლი) ინტაქტურ საკონტროლო ჯგუფში ქემილუმინესცენციის ფარდობითი ინტენსივობა. (II – ფლავონოიდები) ფლავონოიდური ფრაქციის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული ქემილუმინესცენციის ფარდობითი ინტენსივობა. (III – ქვერცეტინი) ქვერცეტინის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული ქემილუმინესცენციის ფარდობითი ინტენსივობა.

როგორც ზემოთ მოცემული სურათებიდან ჩანს, ქემილუმინესცენციის ინტენსივობები სამივე ჯგუფში იყო განსხვავებული, რაც არ კორელირებდა კატალაზას აქტივობის განსაზღვის კლასიკური სტანდარტული მეთოდით მიღებულ შედეგებთან. კერძოდ, ღვიძლის ჰომოგენატის ფრაქციის შემთხვევაში კონტროლთან შედარებით ქემილუმინესცენციის ინტენსივობა გაზრდილი იყო როგორც ფლავონოიდებით დამუშავებულ საკვლევ ჯგუფებში, ასევე ქვერცეტინით ინექცირებულ ობიექტებში. მსგავსი ტენდენცია დაფიქსირდა თავის ტვინთან მიმართებაშიც, (სურ. 4) ფლავონოიდების ზემოქმედებამ მნიშვნელოვნად გაზარდა ქემილუმინესცენციის ინტენსივობა საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით.

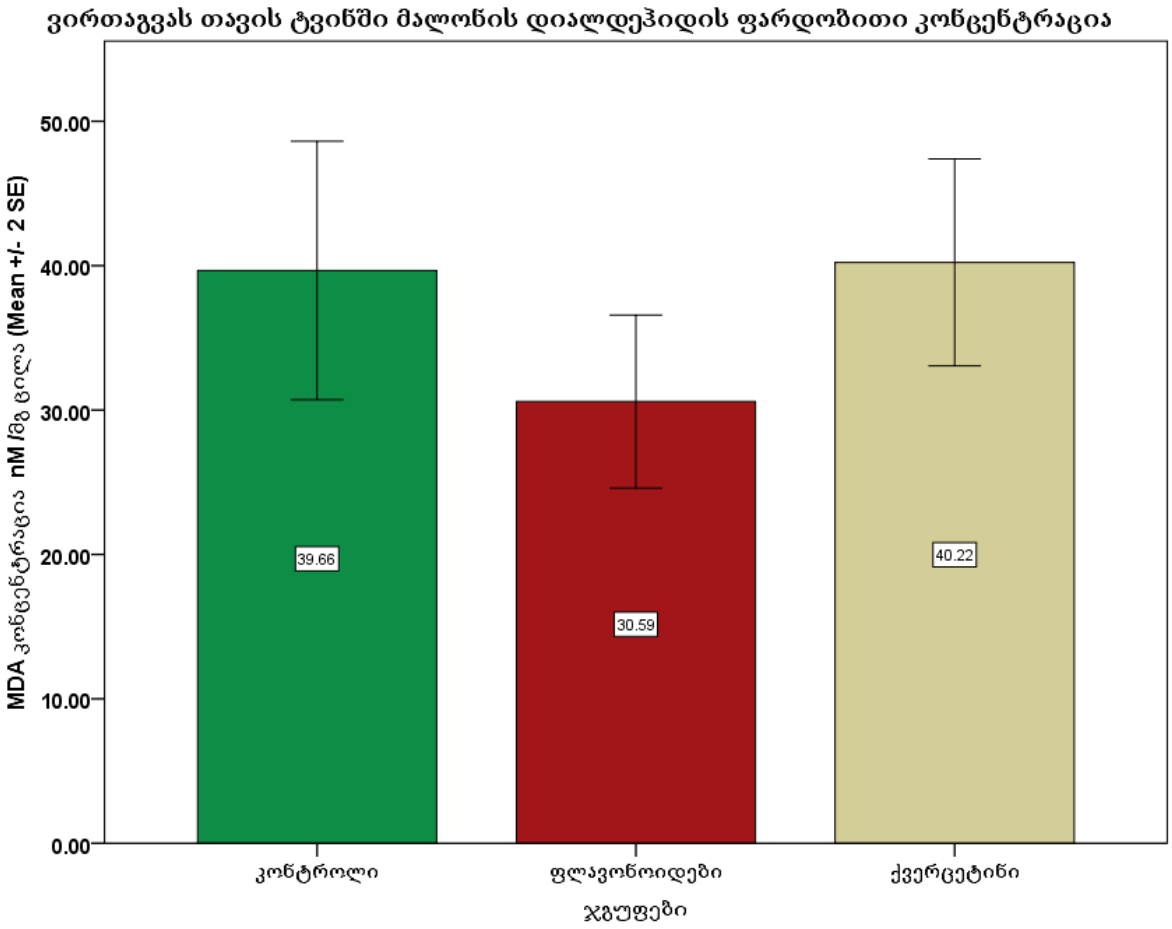
მიღებული შედეგები, ნათლად უნდა მიუთითებდეს, რომ ფლავონოიდებით დამუშავებულ საკვლევ ქსოვილებში ინტენსიურად მიმდინარეობს ზეჟანგური ჟანგვის პროცესები ან დაგროვილი გვაქვს ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტები. აღნიშნული ვარაუდის საფუძველს გვაძლევს ის რომ, in vitro დამატებული წყალბადის ზეჟანგის უმეტესი ნაწილი კონტროლთან შედარებით დაიშალა არა კატალაზით (რომელიც წყალბადის ზეჟანგის დაშლით გვაძლევს სტაბილურ მოლეკულებს წყალსა და მოლეკულურ ჟანგბადს), არამედ პროოქსიდანტული სისტემებით, თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნით, რომლებმაც იმოქმედეს ლუმინოლზე და მოგვცეს ინტენსიური ნათება.

მიღებული სურათიდან იკვეთება, რომ ფლავონოიდების ანუ ძლიერი ანტიოქსიდანტების არაერთჯერად ინექციას ვირთაგვებში უნდა გამოეწვია პათოლოგიური ზეჟანგური ჟანგვის პროცესების გააქტიურება, რაც ეწინააღმდეგება ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებს, რომელთა თანახმად ფლავონოიდების ინტენსიური მიღება ნორმის ფარგლებში არანაირ პათოლოგიას არ იწვევს.

კვლევისათვის მეტი სიცხადის შემოსატანად, გადავწყვიტეთ საკვლევ ობიექტებში შეგვემოწმებინა ზეჟანგური ჟანგვის ერთ–ერთი საბოლოო პროდუქტის მალონილდეალდეჰიდის კონცენტრაცია, რომელიც წარმოადგენს ორგანიზმში მიმდინარე ზეჟანგური ჟანგვის პათოლოგიური პროცესების ერთ–ერთ უტყუარ მარკერს.




სურ #5. ზეჟანგური ჟანგვის ერთ–ერთი საბოლოო პროდუქტის მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია ვირთაგვას ღვიძლში. (I – კონტროლი) ინტაქტურ საკონტროლო ჯგუფში მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია. (II – ფლავონოიდები) ფლავონოიდური ფრაქციის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია. (III – ქვერცეტინი) ქვერცეტინის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია.




სურ #6. ზეჟანგური ჟანგვის ერთ–ერთი საბოლოო პროდუქტის მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია ვირთაგვას თავის ტვინში. (I – კონტროლი) ინტაქტურ საკონტროლო ჯგუფში მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია. (II – ფლავონოიდები) ფლავონოიდური ფრაქციის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია. (III – ქვერცეტინი) ქვერცეტინის სპირტხსნარით, კონც 20 მგ/კგ, 5 დღიანი ინექციის შემდგომ განსაზღვრული მალონის დეალდეჰიდის ფარდობითი კონცენტრაცია.

მალონილდეალდეჰიდის კონცენტრაციები საკვლევ ჯგუფებში მოცემულია სურათი 5 და სურათი 6–ში. მიღებულმა შედეგებმა გვაჩვენა, რომ საკვლევ ჯგუფებში ფლავონოიდების 5 დღიანმა ინექციამ, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით მალონილდეალდეჰიდის კონცენტრაციის სარწმუნო ცვლილება არ გამოიწვია. რაც

ნათლად მიუთითებს იმაზე, რომ არცერთ საკვლევ ობიექტში ზეჟანგური ჟანგვის პათოლოგიური პროცესები არ მიმდინარეობს.

საბოლოო შედეგების შეჯამებით შეიძლება ითქვას, რომ საცდელ ვირთაგვებში ფლავონოიდების 5 დღიანი ინექცია (20 მგ/კგ), არანაირ ზემოქმედებას არ ახდენს ერთ–ერთი ანტიოქსიდანტური ფერმენტის, კატალაზას აქტივობაზე. მაგრამ, ორგანიზმში ააქტიურებს გარკვეულ პროოქსიდანტურ სისტემებს (სავარაუდოდ, ჭარბი ანტიოქსიდანტური სისტემის კომპენსაციის მიზნით), თუმც არა ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის  პათოლოგიური პროცესების ინტენსიფიკაციით.

## დასკვნები

ვირთაგვებში ფლავონოიდების 5 დღიანმა ინექციამ (კონცენტრაციით 20 მგ/კგ) გამოიწვია არაპათოგენური პროოქსიდანტური სისტემების გააქტიურება ჭარბი რაოდენობით ანტიოქსიდანტების კომპენსაციის მიზნით.

წყალბადის ზეჟანგით ინდუცირებული ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდი არ წარმოადგენს ქსოვილებში ფერმენტ კატალაზას აქტივობის განსაზღვრის რელევანტურ მეთოდს.

## გამოყენებული ლიტერატურა


1. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, *30*(1), 11–26.
2. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: Role and Response of Short Guanine Tracts at Genomic Locations. *International journal of molecular sciences*, *20*(17), 4258.
3. Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R. *et al.* Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal* **13,** 39 (2015).
4. Aziz, M. A. , Diab, A. S. , & Mohammed, A. A. (2019). Antioxidant Categories and Mode of Action. In (Ed.), Antioxidants. IntechOpen.
5. Das Kaushik, Roychoudhury Aryadeep. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front ers in Environmental Science (2014)
6. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2019*, 9613090.
7. Karakus, Y. Y. (2020). Typical Catalases: Function and Structure. In (Ed.), Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease. IntechOpen
8. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, *5*, e47.
9. D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, Fitoterapia. Volume 82, Issue 4. 2011 (Pages 513-523)
10. დავით ძნელაძე „ბიოტექნოლოგიის კვლევის თანამედროვე მეთოდები და აპარატურა“, თბილისი 2011;
11. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265–275.
12. Góth L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *196*(2-3), 143–151.