



საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის
სახელობის ქართული უნივერსიტეტი

თამარ კვარაცხელია

ნეფროპროტექტორული ბიოფლავანოიდებისათვის ეფექტური წამალთფორმების შემუშავება

სადოქტორო ნაშრომი შესრულებულია საბუნებისმეტყველო
მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

დოქტორანტის სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

ფარმაცევტულ მეცნიერებათა დოქტორი,

ლია წიკლაური

თბილისი

2019

ანოტაცია

ფლავონოიდები, ბუნებრივი ანტიოქსიდანტების დიდი ჯგუფია, რომელიც ფართოდ არის გავრცელებული მცენარეულ სამყაროში. ანტიოქსიდანტური თვისებების გარდა ფლავონოიდები ავლენენ მთელ რიგ ბიოლოგიურ და ფიზიოლოგიურ ეფექტებს, როგორებიცაა ანთების საწინააღმდეგო, ანტიალერგიული, ჰეპატოპროტექტორული, ნეფროპროტექტორული, ანტითრომბული, ანტივირუსული, ანტიკანცეროგენული თვისებები. ამიტომაც, მათი შესწავლა, აქტიურად ხორციელდებოდა, როგორც ადრეულ წარსულში ასევე გრძელდება უკანასკნელი წლების განმავლობაშიც.

ამავდროულად, ბიოფლავონოიდები ხასიათდებიან დაბალი ბიოშელწვეადობით, რამაც შესაძლოა შეზღუდოს ან სულაც ხელი შეუშალოს მათი ჯანმრთელობისათვის სასარგებლო თვისებების გამოყენებას. სწორედ ამიტომ, ჩვენი კვლევა მიმართულია ფლავონოიდების ბიოშელწვეადობის გასაუმჯობესებლად მათი ეფექტურობის გაზრდის მიზნით.

წარმოდგენილ შრომაში შესწავლილია ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის -კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7-რამნოზიდის (KRR) რეოლოგიური თვისებები. დადგინდა, რომ KRR გამოირჩევა დენადობისა და დაწნეხვის დაბალი მაჩვენებლებით და წამლად ფორმირებისას მოითხოვს ინგედიენტთა შესაფერის შერჩევას.

ჩვენს მიერ შემუშავდა KRR-ის მაღალეფექტური სითხურ-ქრომატოგრაფიული (HPLC) რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდი ბიოლოგიურ სითხეებში; მეთოდი ვალიდირებულია მისი შესაბამისი მახასიათებლებით, დადასტურებულია მაღალი სელექტიურობა, საიმედოობა და სიზუსტე. მეთოდი იძლევა კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7-რამნოზიდის განსაზღვრის საშუალებას ადამიანის მკერდის ადენოკარცინომის უჯრედებში.

კვლევებმა აჩვენა KRR-ის გამტარიანობის უნარი Caco-2 უჯრედებში. შედეგებმა დაადასტურა, რომ გამოკვლეული ნაერთი ხასიათდება ტიპური P-gp-ით განპირობებული სატრანსპორტო თვისებებით, რომლისთვისაც დამახასიათებელია

ტრანსპორტირება უპირატესად ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით. KRR-ის ტრანსპორტირებაში P-gp-ის ჩართულობის გამო კვლევა წარიმართა იმ ტექნოლოგიების და ნივთიერებების სკრინინგზე, რომლებთაც დიდი მნიშვნელობა აქვთ P-gp-ის ATP-აქტიურობის შეკავების პროცესში.

KRR-ის შეღწევადობაზე მუკოადჰეზიურ წამლის ფორმებში გამოყენებული ბიოდეგადირებული პოლიმერების გავლენის შესწავლა მოხდა Caco-2 მონომრიან უჯრედებზე. ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ აბსორბციული ტრანსპორტირება ხიტოზან-გლუტატიონის კონიუგატების არსებობისას 1.36-ჯერ გაუმჯობესდა ხოლო ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით გამოდევნა 2.79 -ჯერ შემცირდა. გლუტატიონი ცალკე და პოლიაკრილის მჟავა-გლუტატიონის კონიუგატი მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენდნენ საკვლევი ობიექტის შეღწევადობაზე.

KRR-ს კომბინაციამ პოლიაკრილის მჟავა-გლუტატიონის კონიუგატებთან 76% შეამცირა TEER მაჩვენებელი, გლუტატიონით მოდიფიცირებულ ხიტოზანმა - 80%, ხოლო ცალკე გლუტატიონმა - 84%-თ. თუმცა ექსპერიმენტის დამთავრების შემდეგ უჯრედების მოთავსებისას საკულტივაციო საკვებ არეში მათი TEER-ის მნიშვნელობა კვლავ გაიზარდა საწყის მნიშვნელობამდე, რაც მიანიშნებდა იმაზე, რომ ბარიერული მთლიანობის დარღვევა შეუქცევადი პროცესი არ იყო.

მიღებული შედეგების მიხედვით დადგინდა, რომ ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდისთვის მუკოადჰეზიური ფორმის შემუშავებისას გლუტატიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანი, შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს პერორალურად მიღებული KRR-ს ბიოშეღწევადობის გასაუმჯობესებლად.

Summary

Flavonoids, a large group of natural antioxidants widely distributed in plant foods. In addition to their antioxidant properties, flavonoids show a number of biological and physiological effects such as anti-inflammatory, anti-allergic, hepatoprotective, nephroprotective, antithrombotic, antiviral, anticarcinogenic and therefore, they have been extensively investigated both in the past and during recent years.

Low bioavailability of flavonoids has been a concern as it can limit or even hinder their health effects. Therefore, our research is directed to improve their bioavailability in order to improve the efficacy of flavonoids.

In the present work the rheological properties of nephroprotective bioflavonoid - Kaempferol 3-robinoside 7- rhamnoside (KRR) for successful dosage form design and development was investigated. The obtained data suggests that KRR possess poor flow properties and compressibility and for successfully formulating it requires a critical approach to ingredient selection and suitable drug delivery system development.

We have elaborated the High-performance liquid chromatography (HPLC) method for quantitative determination KRR in biological fluids. The method has been validated for its relevant characteristics confirming its high selectivity, precision and accuracy. The method allows determination of KRR in human breast adenocarcinoma cells.

Within the study the permeation ability of KRR across Caco-2 cells was shown. Results from the present investigations suggested that tested compound has typical P-gp-involved transport properties including preferential transport in the basolateral to apical direction. Due to the involvement of P-gp in KRR transport, the studies was focused upon the screening appropriate agents and technologies as potentially valuable tools for inhibited ATP-activity of P-gp and thus improving tested compounds absorption in intestine.

We have investigated the permeation enhancing effect of biodegradable polymers on tested compound via the transport studies on Caco-2 cell monolayers. The transport experiments showed that absorptive transport of KRR in presence of chitosan-glutathione conjugate was 1.36-fold improved and basolateral to apical efflux was significantly decreased

(2.79 fold) than pure KRR. Contrariwise, the glutathione and Polyacrylic acid - glutathione showed no significant effect at all.

Combination of KRR with poly (acrylic acid)-glutathione conjugate reduced the TEER value more substantially than with glutathione modified chitosan or glutathione. After three hours the quantity of opening tight junction is about 76% for KRR+PAA-GSH, 80% for KRR+CH-GSH and 84% for KRR+ GSH of the initial value versus about 93% for free KRR.

Within this study it was demonstrated that for development of mucoadhesive form of nephroprotective flavonoids, glutathione modified chitosan may be used for improving the bioavailability of oral administered KRR.

ს ა რ ჩ ე ვ ი

ანოტაცია -----	2
შესავალი-----	7
თავი 1. ლიტერატურული მიმოხილვა	
1.1 ბიოფლავონოიდების მოკლე მიმოხილვა-----	9
1.2 ფლავონოიდების სტრუქტურასა და აქტიურობას შორის დამოკიდებულება---	15
1.3 ფლავონოიდების აბსორბცია, მეტაბოლიზმი და ბიოშელწევადობა-----	23
1.4 P-გლიკოპროტეინების მოკლე დახასიათება-----	33
1.5 ნანოტექნოლოგია და მცენარეული პრეპარატები-----	35
1.6 მუკოაღჭევიური პოლიმერები-----	43
თავი 2. ექსპერიმენტული ნაწილი	
2.1 ობიექტები და კვლევის მეთოდები -----	47
2.2 ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის ტექნოლოგიური პარამეტრების შესწავლა-----	51
2.3 KRR-ის რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდის შემუშავება ბიოლოგიურ სითხეებში-----	63
2.4 KRR-ის ბიოშელწევადობის შესწავლა in-vitro ექსპერიმენტში-----	81
2.5 ბიოფლავონოიდის შელწევადობის გაუმჯობესება ბიოდეგადირებადი პოლიმერების გამოყენებით-----	94
დასკვნები -----	109
გამოყენებული ლიტერატურა -----	111

შესავალი

მიუხედავად იმისა, რომ ფლავონოიდებს ახასიათებთ ბიოლოგიური აქტივობის ფართო სპექტრი, პერორალურად მიღებისას ისინი ავლენენ დაბალ ბიოშელწევადობას, რადგანაც არ შესწევთ უნარი შეაღწიონ უჯრედის ლიპიდურ მემბრანაში, აქვთ მეტისმეტად დიდი მოლეკულური ზომა ან ცუდად შეიწოვებიან; შესაბამისად დაბალია მათი ეფექტურობაც. ამ ნაკლოვანებების გამო, ზოგიერთი ბიოფლავონოიდი კლინიკურად არ გამოიყენება.

სწორედ ასეთი პრობლემების გადაჭრის ინოვაციურ გზას წარმოადგენს ნანოტექნოლოგიები ფარმაცევტულ დარგში.

ორგანიზმში წამლის მიწოდების სისტემების ტექნოლოგიებში, ნანომატარებლები შექმნილია: აქტიური ნივთიერებების დასაცავად *in vivo* დეგრადაციისგან; წამლის შეწოვის გასაუმჯობესებლად ეპითელიუმში ადვილად განაწილების გზით; ფარმაკოკინეტიკის შეცვლისა და მიზნობრივი მიტანისთვის; დოზის, ტოქსიურობის და გვერდითი ეფექტების შემცირებისთვის და ა.შ. გარდა ამისა, ფარმაცევტული ნანო-მატარებლების ზედაპირის მოდიფიცირება გამოიყენება ორგანიზმში სამკურნალო ნივთიერების გადაადგილების კონტროლისთვის. ასეთი მოდიფიკაციები უზრუნველყოფენ სისხლის მიმოქცევის სისტემაში ნანომატარებლების სტაბილურობის და ნახევარდაშლის პერიოდის გაზრდას, სამიზნე პათოლოგიურ ზონაზე პასიურ ან აქტიურ შეტევას და ადგილობრივ მასტიმულირებელზე რეაგირებას, როგორცაა pH და/ან ტემპერატურის ადგილობრივი პათოლოგიური ცვლილებები (Rabanel et al., 2012).

ფლავონოიდების წარმომადგენელ KRR-ის -კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის ნეფროპროტექტორული თვისებებიდან გამომდინარე მნიშვნელოვანია ეფექტური წამალთფორმების შემუშავება მათი ბიოლოგიური შეღწევადობის გაზრდის მიზნით.

კვლევის მიზანი და ამოცანები:

- ბიოფლავონოიდის - კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7-რამნოზიდის (KRR) რეოლოგიური თვისებების შესწავლა.
- ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის - კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7-რამნოზიდის (KRR) ნაწლავური შეღწევადობის შესწავლა ადამიანის კოლინჯის ადენოკარცინომული ურედების (Caco-2), როგორც ნაწლავის ბარიერის მოდელის გამოყენებით.
- ტიპური P-gp-ით განპირობებული სატრანსპორტო თვისებების შესწავლა
- სხვადასხვა პოლიმერის გავლენის შესწავლა ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7-რამნოზიდის (KRR) ნაწლავურ შეწოვაზე.

შრომის მეცნიერული სიახლე:

- შესწავლილ იქნა KRR-ს აბსორბციის უნარი ადამიანის მსხვილი ნაწლავის ადენოკარცინომის Caco-2 უჯრედებში.
- დადგენილ იქნა, რომ KRR-ს ტრანსპორტირებაში ჩართულია P-gp, რაც მის ბიოშეღწევადობას ამცირებს პერორალური მიღებისას.
- კვლევების საფუძველზე შერჩეულ იქნა მუკოადჰეზიური წამლის ფორმა და შესაბამისი პოლიმერები;
- დამუშავებულ იქნა მუკოადჰეზიური ტაბლეტების პირველადი რეცეპტურა.

სადისერტაციო ნაშრომი ძირითადად შესრულდა ფარმაცევტულ საწარმო "ივერიაფარმას" კვლევით ლაბორატორიაში .

დისერტაციის შედეგები გამოქვეყნებულია 3 სტატიაში, მოხსენებულია 4 კონფერენციასა და სიმპოზიუმზე.

სადისერტაციო შრომა შესრულებულია საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის მიმართულების „ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებათა ქიმია და სამკურნალო პრეპარატების ექსპერტიზა“ და დოქტორანტის გეგმის მიხედვით.

თავი 1

ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 ბიოფლავონოიდების მოკლე მიმოხილვა

ბიოფლავონოიდები ფენოლური შენაერთების ყველაზე ფართოდ გავრცელებული ჯგუფია; ამ ნაერთებით განსაკუთრებით მდიდარია უმაღლესი მცენარეები. უფრო მეტად გვხვდება ტროპიკულ და ალპურ ზონებში, ისინი პრაქტიკულად მცენარის ყველა ნაწილში მოიპოვება, მაგრამ განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით არის წარმოდგენილი მცენარის მიწის ზედა ნაწილებში, ყვავილებში, ფოთლებში და ნაყოფებში; აღსანიშნავია, რომ ახალ ყვავილებში და უმწიფარ ნაყოფებში უფრო მეტი რაოდენობითაა და წარმოადგენენ მცენარეებისთვის ფერის განმსაზღვრავ კომპონენტებს. ფლავონოიდების სინთეზი არ ხდება ცხოველების და ადამიანების ორგანიზმში; დადასტურებულია, რომ ისინი ადამიანების და ასევე ცხოველების კვებისთვის აუცილებელ კომპონენტებს წარმოადგენენ. ცხრილ 1.1.-ში მოცემულია საკვებად გამოყენებული მცენარეები, რომლებიც წარმოადგენენ სხვადასხვა ფლავონოიდების წყაროს (Koes et al., 2005).

ცხრილი 1.1.

ფლავონოიდების წყარო საკვები მცენარეები

ჯგუფი	ფლავონოიდი	წყარო	ლიტერატურა
ფლავანოლი	(+)-კატეჟინი (-)-ეპიკატეჟინი ეპიგალოკატეჟინი	ჩაი	(Lopez et al., 2001)
ფლავონი	ტრიცინი, აპიგენინი რუტინი, ლუტეოლინი და	სხვადასხვ ხილის კანი, წითელი ღვინო, წითელი წიწკა,	(Lopez et al., 2001)

	ლუტეოლინ გლიკოზიდები	პომიდვრის კანი და წიწიბურა	
ფლავონოლი	კემფეროლი, კვერცეტინი, მირცეტინი და თამრიქსეტინი	ხახვი, წითელი ღვინო, ზეთისხილის ზეთი, კენკრა და გრეიფრუტი	(Stewart et al., 2000)
ფლავანოლი	ნარინგენინი, ნარინგინი, ტაქსიფოლინი და ჰესპერიდინი	ციტრუსები: გრეიფრუტი, ლიმონი და ფორთოხალი	(Miyake et al., 2000)
იზოფლავონი	გენისტინი, დაიძინი	სოიოს მარცვალი	(Stewart et al., 2000)
ანთოციანიდი	აპიგენიდინი, ციანიდინი	ალუბალი, ჟოლო, მარწყვი	(Stewart et al., 2000)

ფლავონოიდები ფართოდ არიან გავრცელებული სამკურნალო მცენარეებში (Pascual et al., 2001) (ცხრილი 1.2).

ცხრილი 1.2.

ფლავონოიდების წყარო სამკურნალო მცენარეები

მცენარე	ოჯახი	ფლავონოიდი	გამოყენებული ლიტერატურა
ალოე ვერა	Asphodelaceae	ლუტეოლინი	(L'razaro M. L., 2009)
არყის ხე	Betulaceae	ქვერცეტინი	(L'razaro M. L., 2009)
გულყვითელა	Compositae	იზორამნეტინი	(L'razaro M. L., 2009)
პასიფლორა	Passifloraceae	ვიტექსინი	(L'razaro M. L., 2009)
ცაცხვი	Tiliaceae	ჰიპეროზიდი	(L'razaro M. L., 2009)
ტყის პიტნა	Lamiaceae	ლუტეოლინ-7-O გლიკოზიდი	(L'razaro M. L., 2009)
ძირტკბილა	Leguminosae	ლიქვირიტინი	(L'razaro M. L., 2009)

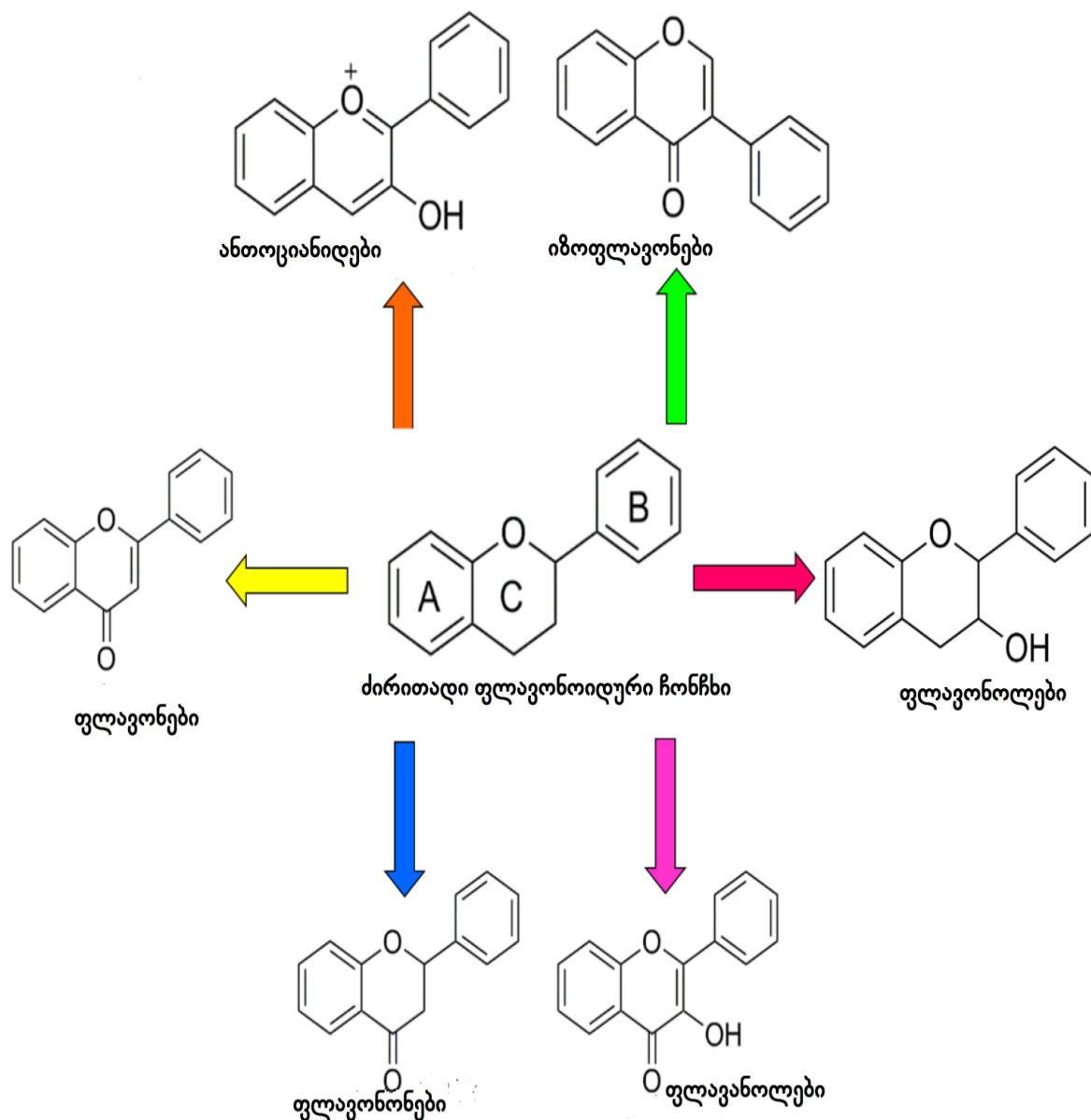
ისინი გვხვდება მცენარის ყველა ნაწილში (Yahara et al., 2000), მათ ძალიან დიდი როლი ეკისრებათ მცენარეთა საციცოცხლო ციკლის რეგულირებაში (Cushnie et al., 2005).

1930 წელს ახალი ნივთიერების გამოყოფა მოხდა ციტრუსებიდან, მაშინ მიიჩნიეს, რომ ეს იყო ვიტამინების ახალი კლასის წარმომადგენელი და კლასიფიცირდა როგორც P - ვიტამინი. მოგვიანებით კი ნათელი გახდა, რომ ეს ნივთიერება იყო ფლავონოიდი (რუტინი). დღეისათვის 9000 ზე მეტი ფლავონოიდი აღმოჩენილი (Wang et al., 2011).

ფლავონოიდები ქიმიური სტრუქტურით წარმოადგენენ 15 ნახშირბადატომიან ნაერთებს, რომელიც შედგება ბენზოლის 2 ბირთვისა (A და B ბირთვი) და მათი დამაკავშირებელი პირანის რგოლისგან (C). ეს ნივთიერებები იყოფა სხვადასხვა ჯგუფებად: ფლავონებად, ფლავანებად, ფლავანონებად და სხვა. ფლავონოიდების ძირითადი სტრუქტურა და მათი სხვადასხვა კლასები ნაჩვენებია სქემა 1.1-ზე. ისინი ერთმანეთისგან განსხვავდებიან დაჟანგვის ხარისხით და C - რგოლში ჩამნაცვლებლის ადგილმდებარეობით, მაშინ როცა ინდივიდუალური ნაერთები ჯგუფის შიგნით ერთმანეთისგან განსხვავდებიან A და B ბირთვში ჩამნაცვლებლის ადგილმდებარეობით (Wang et al., 2011) (იხ.სქემა 1. 2).

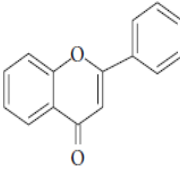
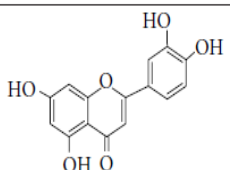
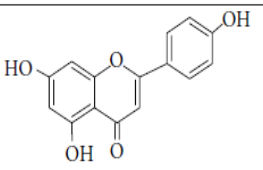
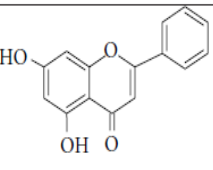
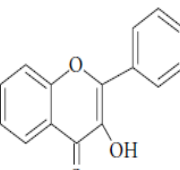
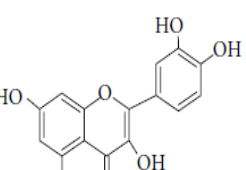
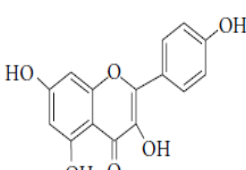
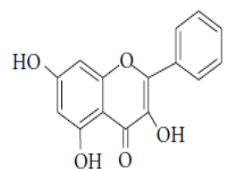
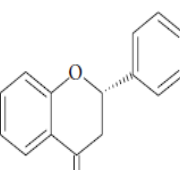
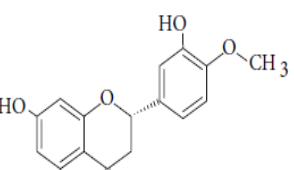
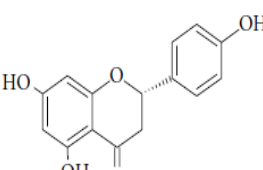
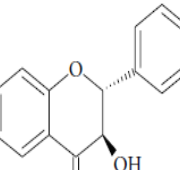
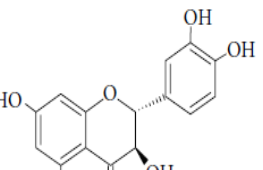
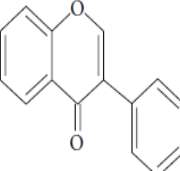
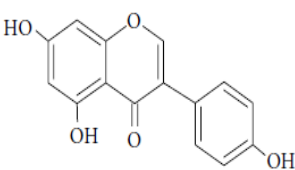
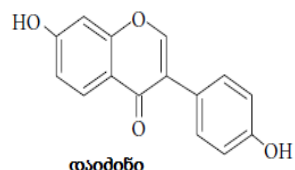
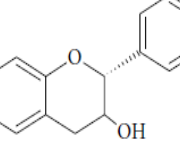
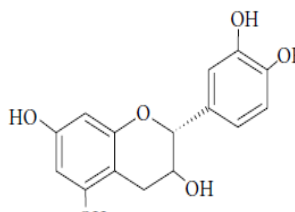
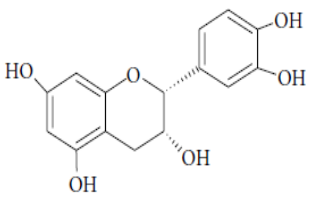
მათ უმეტესობას განიხილავენ, როგორც ფლავანისა და ფლავონის ნაწარმებს. აქ ჟანგბადის შემცველი ჰეტეროციკლური ბირთვი პირანის ან γ -პირონის ნაწარმია. მათი ფორმები ერთმანეთისაგან განსხვავდება A და B ბირთვში -OH, -OCH₃ და -CH₃ ჯგუფების მდებარეობით. მონოსაქარიდებთან, დისაქარიდებთან და ტრისაქარიდებთან ისინი იძლევიან გლიკოზიდების დიდ რაოდენობას. ამასთან ერთად მათ მრავალფეროვნებას განაპირობებს ზოგიერთ ფლავონოიდში ნახშირბადის ასიმეტრიული ატომების არსებობა (მაგალითად ფლავონონებში, კატექინებში, ლეიკოანთოციანიდებში). ფლავონოიდებში გვხვდება 1-3 შაქროვანი ნაშთი; გლიკოზიდური კავშირის წარმოქმნაში მონაწილეობს ორი OH - ჯგუფი. მონოსაქარიდები არიან მცენარეებისათვის ჩვეული შაქრები: D-გლუკოზა, D-გალაქტოზა, D-ქსილოზა, L-რამნოზა, L-არაბინოზა, ზოგჯერ კი D-გლუკურონის მჟავა. ყველა მათგანი პირანოზული ფორმითაა, მარტო არაბინოზაა ფურანოზული ფორმით.

ჩვეულებრივ შაქრები უერთდება ფენოლურ ჰიდროქსილებს β -კავშირით. ფლავონოიდურ გლიკოზიდებში დადგენილია სულ რამდენიმე დისაქარიდი და ნაკლები ტრისაქარიდი.



სქემა 1.1. ფლავონოიდების ძირითადი სტრუქტურა და სხვადასხვა კლასები

ფლავონოიდების სტრუქტურა

ფლავონოიდების ჯგუფი	სტრუქტურული ჩონჩხი	მათი წარმომადგენლები		
ფლავონები		 ლუტეოლინი	 აპიგენინი	 ტრიცინი
ფლავონოლები		 კვერცეტინი	 კემფეროლი	 გალანგინი
ფლავანონები		 ჰესკერეტინი	 ნარინგენინი	
ფლავანოლოლი		 ტაქსიფოლინი		
იზოფლავონები		 გენისტინი	 დაიძინი	
ფლავან-3-ოლები		 კატეკინი	 ეპიკატეკინი	

სქემა 1. 2. ფლავონოიდების სხვადასხვა კლასის წარმომადგენლები

ფლავონები წარმოადგენენ 2-ფენილბენზო- γ -პირონის (2-ფენილ-ქრომონის) წარმოებულს, საკმაოდ სტაბილური ნივთიერებებია და მცენარეებში ხშირად გვხვდებიან.

ფლავონოლები, ფლავონოიდებში ყველაზე დაჟანგული ნაერთებია. ფლავონებისაგან განსხვავებით, შეიცავენ ჰიდროქსილს C – 3 მდგომარეობაში და ნაკლებად სტაბილური არიან, განსაკუთრებით, ჟანგბადის თანაობისას (Narayana et al., 2001).

კატექინები, ფლავან-3-ოლის წარმოებულები, ფლავონოიდებს შორის ყველაზე ალდგენილ ფორმას წარმოადგენენ. დიდი ხნის განმავლობაში ითვლებოდა, რომ კატექინები გლიკოზიდებს არ წარმოქმნიან. ამჟამად ცნობილია მათი გლიკოზილირებული ფორმები.

ფლავანონოლები (დიჰიდროფლავონოლები - γ) ფლავონებისა და ფლავონოლებისაგან განსხვავებით, არ შეიცავენ ორმაგ კავშირს C₂- C₃ მდგომარეობაში, რაც იწვევს C-3 ჰიდროქსილის ენოლური თვისების დაკარგვას, ახასიათებს სტერეოიზომერია და გარდაქმნის ზოგიერთი სპეციფიკური რეაქცია.

ფლავანონები წარმოადგენენ ფლავონოიდების პატარა ჯგუფს. მათ სტრუქტურას საფუძვლად უდევს არამდგადი დეჰიდრო γ -პირონის ბირთვი, რომელიც ტუტეების თანაობისას განიცდის ცვლილებებს (იხსნება) და ეს შენაერთები გარდაიქმნება ხალკონებად. ფლავანონებს აქვთ ნახშირბადის ერთი ასიმეტრიული ატომი (C₂) და გვხვდებიან 2 იზომერისა და 1 რაცემატის სახით. მცენარეებში ჩვეულებრივ არის მარცხნივ მბრუნავი ფორმები.

ანთოციანიდინები 2-ფენილბენზოპირილის ანუ ფლავილის წარმოებულებია და წარმოადგენენ მცენარეული შემფერავი ნივთიერებების – ანთოციანების აგლიკონებს, რომლებითაც განპირობებულია მცენარის ყვავილის, ნაყოფის, ფოთლის შეფერილობა (ლურჯი, იისფერი, წითელი, ყავისფერი და სხვ.). ფერთა ტონი დამოკიდებულია მათი მოლეკულების ჰიდროქსილების, მეთილირების ხარისხსა და მეტალებთან კომპლექსნაერთის ხარისხზე.

1.2 ფლავონოიდების სტრუქტურასა და აქტიურობას

შორის დამოკიდებულება

სხვადასხვა დაავადებებზე ფლავონოიდების გავლენის შესახებ ჩატარებულია უამრავი კვლევა (Shibat et al., 2014). დადგენილია, რომ ამ ნივთიერებებს თავიანთი ტიპიური სტრუქტურით შეუძლიათ ჩართვა ფერმენტულ რეაქციებში და ეფექტური ფარმაკოლოგიური თვისებების გამოვლენა (Rakers et al., 2014. Giuliani et al., 2014).

ქიმიურ სტრუქტურასა და ფარმაკოლოგიურ აქტიურობას შორის ურთიერთკავშირი დიდ ინტერესს იწვევს და დღემდე მიმდინარეობს კვლევები ამ მიმართულებით.

დადასტურებულია რომ ფლავონოიდებს გააჩნიათ: ანტივირუსული, ანტიკანცეროგენული, ანტინეუროპათოლოგიური, კარდიოპროტექტორული, ანთების საწინააღმდეგო, ანტიდიაბეტური და ანტიოქსიდანტური თვისებები (სქემა 1.3.) (Williams et al., 2004).

დადგენილია მათი ანტივირუსული მოქმედება გრიპის ვირუსის (Rakers et al., 2014), C-ჰეპატიტის ვირუსის (Shibata et al., 2014), *Escherichia coli*-ის წინააღმდეგ (Nguyen et al., 2013). არსებობს მტკიცებულებები ფლავონოიდების ანტიალერგიული მოქმედების შესახებაც. ისინი იცავენ ადრენალინს ოქსიდაციური სტრესისგან, რაც თავის მხრივ, ასტიმულირებს კორტიკოსტეროიდების გამოყოფას. დადასტურებულია ფლავონოიდების ზეგავლენით ჰისტამინის დონის შემცირება სისხლში.

ბევრი მექანიზმი უსვამს ხაზს ფლავონოიდების ანტიკანცეროგენულ მოქმედებას, მაგ. როგორცაა აპოპტოზის ინდუქცია (Krych et al., 2013), პროტეოსომული ინჰიბირება (Amrutha et al.,- 2014) დიფერენცირებული ინდუქცირება, რეცეპტორული კავშირი ან ურთიერთქმედება კანცეროგენ დაკავშირებულ ფერმენტთან (Huang et al., 2010). უფრო მეტიც, ფლავონოიდებს შეუძლიათ გამოავლინონ სპეციფიური ციტოტოქსიური მოქმედება კიბოს უჯრედებზე, ამიტომ

დიდი ყურადღების ქვეშ მოექცა ფლავონოიდების გამოყენება, როგორც კიბოს საწინააღმდეგო საშუალებების (Zhang et al., 2014).



სქემა 1.3. ფლავონოიდების ფარმაკოლოგიური თვისებები

ფლავონოიდური ექსტრაქტები და მონომერები ეფექტურად გამოიყენება ნევროლოგიაში, რადგან ისინი ხელს უშლიან ნეიროდეგადაციას (Orhan et al., 2013).

ვაშლის კანში (Balasuriya et al., 2012), ხახვში (Li et al., 2013), მოცვში არსებული ფლავონოიდების როლი გულსისხლძარღვთა დაავადებების პროფილაქტიკაში უკვე ცნობილია (Hamauzu et al., 2011). მათ ახასიათებთ P-ვიტამინური აქტიურობა, ამცირებენ კაპილარების კედლების განვლადობას, მათ სიმყიფეს, ხელს უწყობენ სისხლძარღვების ნორმალურ ფუნქციონირებას. დადგენილია, რომ ეს ეფექტი ხორციელდება ერთ-ერთი ცნობილი მექანიზმით: ბიოფლავონოიდები განაპირობებენ კოლაგენის ჯაჭვების შეკავშირებას, ვიტამინ C-ს სტაბილიზაციას. ვიტამინ C-ს გავლენით აქტიურდება ფერმენტები პროლილჰიდროქსილაზა და ლიზილჰიდროქსილაზა. ეს უკანასკნელნი აკატალიზებენ პროლინისა და ლიზინის

ჰიდროქსილირებას. შედეგად ხდება ამ ნაერთების ჩართვა კოლაგენის სტრუქტურულ ჯაჭვში. გარდა ზემოთ აღნიშნული ეფექტებისა, ბიოფლავონოიდები არეგულირებენ სისხლის რეოლოგიურ თვისებებს, აქვთ ასპირინის მსგავსი ანტიაგრეგანტული ეფექტი. მათი ინჰიბიციური ზემოქმედება ვრცელდება მრავალ პროაგრეგატულ და პროკოაგულანტურ ფაქტორზე.

ზოგადად, ძალიან დიდია ფლავონოიდების როლი ანთებითი დაავადებების მკურნალობაში, როგორცაა ლეიკემია, სეფსისი, ასთმა, სკლეროზი, ათეროსკლეროზი, ფსორიაზი, ალერგიული რინიტი, კოლიტი, რევმატოიდული ართრიტი და ა.შ. (Isoda et al., 2014; Martinez-Fernandez et al., 2015). შესწავლილია მათი გავლენა მრავლობით ანთებით მედიატორებზე, როგორცაა პლაზმური პროტეაზები, პროსტაგლანდინები, ლეიკოტრიენები, ინტერლეიკინები, აზოტის ოქსიდი, პროინფლამატორული ციტოკინები, (Medda et al., 2015; Das et al., 2012) ასევე შესაბამისი სასიგნალო გზები (During et al., 2013). ზოგადად, ფლავონიდების ანთების საწინააღმდეგო თვისება ფართოდ არის შესწავლილი, მაგრამ კონკრეტული მექანიზმი, რომელიც შეიძლება არ იყოს ერთიანი ყველა ფლავონოიდისთვის, განაპირობებს სტრუქტურისა და აქტიურობის ურთიერთგავლენის სიღრმისეული შესწავლის აუცილებლობას.

სასურველია ფლავონოიდების ანთების საწინააღმდეგო ეფექტების სტრუქტურული ასპექტები შეჯამებულ იქნას შემდეგნაირად: ა) $C_2=C_3$ ორმაგმა ბმამ შეიძლება განსაზღვროს მოლეკულის სივრცითი მდგომარეობა. მისი არსებობის შედეგად დიდია მოცულობა/ზედაპირის თანაფარდობა, ამიტომაც დიოსმინი ავლენს უფრო ძლიერ ეფექტებს ვიდრე ჰესპერიდინი (Celik et al., 2012); ბ) ჰიდროქსილირების ტიპი, როგორცაა 3' ჰიდროქსილირება (შედეგად, ფისეტინი ავლენს მაქსიმალურ ეფექტს), იზოფლავონოიდების შემთხვევაში, განსაკუთრებით B ბირთვის კატექოლის ფრაგმენტის 5-ჰიდროქსილირება უზრუნველყოფს უჯრედების დიფერენციაციისთვის ინდუცირების ეფექტებს (აპიგენინი vs ქრიზინი)(During et al., 2013); გ) მეთოქსილირება მნიშვნელოვნად აძლიერებს ფლავონოიდების ანთების საწინააღმდეგო თვისებებს (ქრიზინის O-მეთილირება) (During et al., 2013); დ) დაბალი ლიპოფილურობის მქონე გლიკოზიდებმა გამოამჟღავნეს ნაკლებად ძლიერი ანთების საწინააღმდეგო

თვისებები, რაც შეიძლება დაკავშირებული იყოს მემბრანის გამტარობის შემცირებასთან (Isoda et al., 2014).

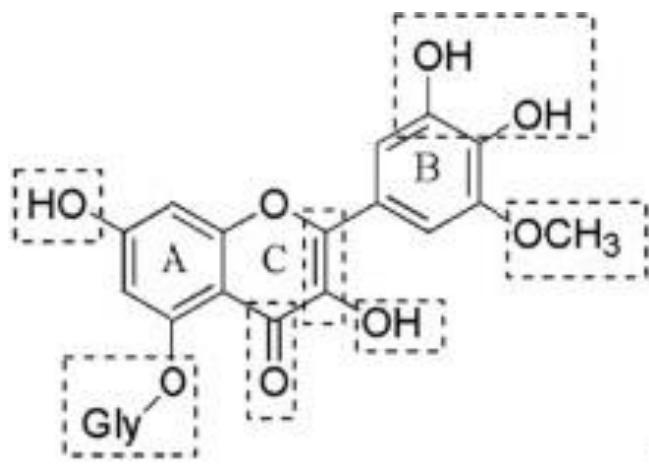
ანთების საწინააღმდეგო თვისებები განპირობებულია იმით, რომ ისინი ახდენენ არაქიდონის მჟავის სასიგნალო გზების მოდულირებას, სპეციფიური გენების ექსპრესიის ინჰიბირებასა და საჭიროებისამებრ ანთების საწინააღმდეგო მედიატორებისა და ციტოკინების გამომუშავების სტიმულირებას. ფლავონოიდებს ახასიათებთ ანთებითი მედიატორების – ციკლოოქსიგენაზას (ცოგ-1, ცოგ-2), ლიპოქსიგენაზას, სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორის (TNF- α), ჰიალურონიდაზას, ანთებითი პროსტაგლანდინების, ინტერლეიკინების – IL-1, IL-6, IL- β , ლეიკოტრიენების და სხვ) სინთეზის დათრგუნვა.

მრავალი კვლევა მოწმობს ფლავონოიდების ეფექტურობას ჰიპერგლიკემიის მკურნალობაში. შაქრიანი დიაბეტი არის მულტიფაქტორული, ქრონიკული ჰიპერგლიკემიური დაავადება. ამკარაა, ფლავონოიდების სასარგებლო როლი შაქრიანი დიაბეტის მკურნალობაში, იმ თვალსაზრისით რომ შემცირებულია გართულებები და გვერდითი მოვლენები (Yeon et al., 2015). ამასთანავე, არეგულირებენ ლიპიდურ ცვლას, ამცირებენ საერთო ქოლესტერინის, დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების დონეს სისხლში ღვიძლის ფერმენტებზე ზემოქმედების გზით, იცავენ მათ თავისუფალ რადიკალოვანი ჟანგვისგან (Pham-Huy et al., 2008), ამცირებენ ტრიგლიცერიდებს, არეგულირებენ შაქრის ცვლას.

ასევე, ფლავონოიდებს გააჩნიათ ანტიოქსიდანტური თვისებები (Pal et al., 2009), მათი მოქმედებით ხდება ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივაცია და ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ნორმალიზება (Hidalgo et al., 2010). ფლავონოიდებს გააჩნიათ რა უნარი მოახდინონ ჟანგბადის აქტიური ფორმებისა და აზოტის შემცველი აქტიური რადიკალების ინჰიბირება, ამასთან ერთად შეუძლიათ იმ ფერმენტების აქტიურობის დაქვეითება, რომლებიც მონაწილეობას იღებენ თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის პროცესში, მათ შორის: ციკლოოქსიგენაზა, ლიპოოქსიგენაზა და ინდუციბელური ტიპის აზოტის მონოოქსიდის სინთაზა, რაშიც გამოიხატება მათი ანტიოქსიდანტური თვისებები (Ravisha-nkar et al., 2013).

თავისუფალი რადიკალები (სუპეროქსიდი O₂⁻, ჰიდროქსილის რადიკალი OH⁻, წყალბადის პეროქსიდი H₂O₂, ლიპიდური რადიკალები) ორგანიზმში ბიოქიმიური რეაქციების შედეგად წარმოიქმნება და მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ სხვადასხვა ფიზიოლოგიურ პროცესებში. ისინი აუცილებელია იმუნური, ღვიძლის ციტოქრომული სისტემის ნორმალური ფუნქციონირებისთვის, ანტიბაქტერიული და ანტივირუსული დაცვის მექანიზმებში. პათოლოგიური მდგომარეობების დროს, როდესაც ირღვევა ბალანსი ოქსიდანტებსა და ანტიოქსიდანტური დაცვის სისტემებს შორის, თავისუფალი რადიკალები იწვევენ უჯრედებისა და მათი სტრუქტურების დაზიანებას DNM-ის ჩათვლით. დისბალანსს იწვევს ერთის მხრივ, ენდოგენური ანტიოქსიდანტური სისტემის სისუსტე (სუპეროქსიდდისმუტაზა, კატალაზა, გლუტათიონი და სხვ), ან ნუტრიციული ანტიოქსიდანტების დეფიციტი (ფლავონოიდები, ვიტ. A, C, E, მინერალები – სელენი, ცინკი, ლიპოის მჟავა და სხვ.) ოქსიდაციური სტრესი არის ერთ-ერთი პათოგენეზური რგოლი მრავალი დაავადებისა. მათ შორისაა კარდიოვასკულური დაავადებები, ასთმა, დიაბეტი, სიმსივნური დაავადებები, კატარაქტა, დიაბეტი, გასტროენტერალური ანთებითი დაავადებები. აქედან გამომდინარე, აშკარა ხდება ფლავონოიდების უზარმაზარი როლი დაავადებათა მკურნალობასა და პროფილაქტიკაში.

ამრიგად, ფლავონოიდების სტრუქტურასა (სქემა1.4) და ფარმაკოლოგიურ აქტიურობას შორის არსებობს ურთიერთგავლენა და სხვადასხვა როლი აქვს სხვადასხვა ფუნქციურ ჯგუფს, რაც ნათლად ჩანს ცხრილ-1.3-ში.



სქემა 1.4. ფლავონოიდების სტრუქტურა

ცხრილი 1.3.

ფლავონოიდების სტრუქტურასა და ფარმაკოლოგიურ აქტიურობას შორის ურთიერთკავშირი

თვისება ჯგუფი	ანტივირუსული/ანტიბაქტერიული	ანტიკანცეროგენული	ანტინეუროპათოლოგიური	კარდიოპროტექტორული	ანთების საწინააღმდეგო	ანტიდიაბეტური	ანტიოქსიდანტური
კატექოლი	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
OH-ების რიცხვი	↓	↑	↑	-	↑	↑	↓
O-Me	↓	↑	↑	↑	-	↓	↑
C ₂ =C ₃	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
3-OH	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
4-კარბონილი	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
გლიკოზილირება	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓

ჩვენი დღიური კვების რაციონში მნიშვნელოვანი რაოდენობით ხვდება ფლავონოიდები რადგან ისინი ძალიან ფართოდ არიან გავრცელებულები.

ცხოველებში, ფლავონოიდების ტოქსიკურობა არის ძალიან დაბალი. ვირთხების შემთხვევაში, თითოეულისთვის LD₅₀ არის 2-10 გ ფლავონოიდების უმეტესი ნაწილისთვის. მსგავსი დოზებით მიღება ადამიანებში სავსებით არარეალურია. ადამიანებში, სიფრთხილის ზომებიდან გამომდინარე რეკომენდირებულია 1გ-ზე ნაკლები რაოდენობით მიღება დღის განმავლობაში (Sahni et al., 2011). ის ფაქტი, რომ ფლავონოიდების დღიური ნორმა ადამიანისათვის 1გ-ს აღწევს და გაცილებით აღემატება ორგანიზმისთვის მნიშვნელოვან სხვა ანტიოქსიდანტების α-ტოკოფეროლის, ასკორბატისა და გლუტატიონის მოთხოვნის დონეს, მიუთითებს მათ დაბალ ტოქსიურობაზე და უდიდეს მნიშვნელობაზე ადამიანისა და ცხოველთა ორგანიზმისთვის, რომელთაც განვითარებული აქვთ ამ ბუნებრივი ნაერთების სასარგებლო თვისებების გამოყენების უნარი.

Dunnick და Hailey იტყობინებოდნენ, რომ ზედიზედ რამდენიმე წლის განმავლობაში ქვერცეტინის მაღალი დოზებით გამოყენებამ, შეიძლება გამოიწვიოს სიმსივნეების ფორმირება თაგვებში (Yen et al., 2008) თუმცა, სხვა გრძელვადიანი

კვლევებით, კანცეროგენობა არ გამოვლენილა (Su et al., 2008). უფრო მეტიც, დადასტურებულია ქვერცეტილის ანტი-მუტაგენური ეფექტები *in vivo* ცდებში.

KRR წარმოადგენს კემფეროლ-3-O-D-რობინოზიდი-7-O-L-რამნოპირანოზიდს, ან კემფეროლ-3-რამნოზილგალაქტოზიდი-7-რამნოზიდს. IUPAC სახელია: 7-[(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-1-benzopyran-3-yl 6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-galactopyranoside.

KRR ლიტერატურაში პირველად ცვენგერმა და დრონკემ 1861 წელს გამოიყენეს. მათ დადასტურეს KRR-ს მიღება ცრუ აკაციიდან (*Robinia pseudoacacia*). უკანასკნელმა კვლევებმაც დადასტურა მათი არსებობა ამ მცენარეში (Demeshko O.V., 2007; Veitch N.C., et al, 2010;). თუმცა თავიდან აღწერილი იყო როგორც ქვერცეტილის გლუკოზიდი, მისი სრული სტრუქტურა ზემფელისა და ბოგნარის მიერ იქნა შემუშავებული 1941 წელს (Veitch N.C., 2011). კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის მიღება ხდებოდა შემდეგი პარკოსანი მცენარეებიდან: კავკასიურ სამყურა (*Trifolium ambiguum Bieb.*) (Shalashvili K.G., 1974); ტკბილი სამყურა, ძიძო (*Melilotus albus Medik*) და მელილოტუსი (*M. altissimus Thuill.*) (Plouvier V., 1963), *Melilotus elegans Salzm. ex Ser.* (*M. abyssinica Bak.*) (Kaleab Asres et al., 2000), *M. officinalis (L.) Desr.* (Sutiashvili M. G., Alaniya M. D., 1999); რობინია (*Robinia viscosa Vent. (R. glutinosa Sims.)*) (Maksyutina N.P., 1969); ოქსიტროპია (*Oxytropis varlakovii Serg.*) (Bei Thi Thuong, Blinova K.F., 1974); პუერარია (*Pueraria lobata (Willd.) Ohwi (P. hirsuta (Thunb.) Matsum)*) (Saiiad, S. A., et al., 1979; Ching S.Lau et al., 2005; N. F. Chkadua et al., 1997); ვინია ლუტელას (*Vigna luteola*) კემფეროლის ქიმიოტიპი TVnu 172 (V. Lattanzio et al., 2012); ოთხი ბოტანიკური სახეობა ფაბას (ფართო) ლობიო *Vicia faba* (Perrino P. et al., 1988).

კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის იდენტიფიცირება მოხდა ასტრაგალუსის შემდეგ სახეობებში: *Astragalus dipelta Bunge* (Lukyanchikov M.S. et al., 1987), *A. adsurgens Pall* (Komissarenko I., Polyakova L.V., 1987), *A. levieri Freyn* (Guzhva et al., 1983), *A. falcatus Lam.* (Alaniya M.D. et al., 1972), *A. torrentum Bunge* (Guzhva N.N. et al., 1984), *A. eupeplus Barneby* (Yasinov R.K., 1986), *A. karakuschensis Gontsch* (Guzhva N.N. et al., 1990), *A. polygala Pall.* (Kazakov A.L. et al., 1981), *A. subrobustus Boriss.* (Guzhva N.N. et

al., 1987), *A. shikokianus* (Yahara S. et al., 2000). ასტრაგალუსის უკრაინულ სახეობებში კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის იდენტიფიცირება მოხდა მცენარეებში: *A. galegiformis* L. (Alaniya M.D., 1990), *A. glycyphyllos* Pall., *A. utriger* Pall., *A. danicus* Retz., *A. tauricus* Pall., *A. monspessulanus* L. (Kovaleva A.M., Komissarenko A.N., 1999; Kovaleva A.M. et al., 2011). კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის შემცველობა ასევე აღმოჩნდა სახეობებში: *Astragalus dolichophyllus* Pall. and *A. davuricus* (Pall.) DC. (Kovaleva A.M. et al., 2011), *Phaseolus angularis* W.F. Wight, *Pueraria thunbergiana* Bent., *Vigna marginata* (Hon-Yen Hsu et al., 1982), *Canavalia gladiata* (Ching S.Lau et al., 2005), *Lespedeza bicolor* Turcz (Gulyaev V.G. et al., 1993). არაპარკოსან მცენარეებში კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდი აღმოჩნდა გველის სუროს სახეობებში: *Vinca major* (Kowalewski Z., Kowalska M., 1966; Didem Söhretoglu et al., 2013), *V. minor* (Szostak H., Kowalewski Z., 1969), *V. erecta* (Akhmedzhanova V. I., 1986); ლოტუსში (*Nelumbo nucifera* Gaertn) (Rahman W. et al., 1962); და კორდიას ზოგიერთ სახეობაში (*Cordia spp*) (Ficarra R. et al., 1995); ასევე, ჩირანთოს ალიონში (*Cheiranthus allionii*) (Maksyutina N. P., 1965).

კვლევების შედეგების შეფასებით აღმოჩნდა, რომ ფლავონოიდ კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის გავრცელება მცენარეებში რამდენადმე შეზღუდულია; მისი მოძიება ხდება 5 ოჯახის 43 სახეობაში. ყველაზე დიდი მაჩვენებელი (36) არის პარკოსანთა ოჯახში, მათ შორის 18 ასტრაგალუსია, ამდენად ის შეიძლება ჩაითვალოს, როგორც კვლევის ყველაზე საიმედო ტაქსონი კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის შემცველი მცენარეული მედიკამენტების შემდგომი განვითარებისათვის. KRR-ის შემცველი მცენარეები, რომლებიც უკრაინაში ველურად იზრდებიან 18 სახეობით არიან წარმოდგენილნი. გამოკვლეულია *Lespedeza bicolor* Turcz. (Lysiuk R., Skibitska M., 2013) და *Astragalus falcatus* Lam (Sereda O.V. et al., 2006).

საქართველოში გავრცელებულ ნამგალნაყოფა ასტრაგალისა (*A.falcatus* Lam) და ბუსუსოვანი პუერარიას (*Pueraria hirsuta* L.) მიწისზედა ნაწილებიდან მიღებულ კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის საფუძველზე იოველ ქუთათელაძის ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტში შემუშავებულ იქნა ჰიპოაზოტემიური პრეპარატი

ფლარონინი ტაბლეტების სახით (Alania et al., 1996; Alania 1998; E.P Kemertelidze et al., 2008).

ჰიპოაზეტემური თვისებებიდან გამომდინარე, KRR როგორც ბუნებრივი ფლავონოიდი, იმსახურებს განსაკუთრებულ ყურადღებას. მისი შემცველი სამედიცინო მცენარეების შესაბამისად შეფასება მეტად მნიშვნელოვანია რათა ჩატარდეს მათი გავლენის სკრინინგი თირკმელზე და ხელი შეეწყოს ნეფროპროტექტორული (ჰიპოაზეტემური) აქტივობის მქონე მცენარეული მედიკამენტების განვითარებას.

სხვადასხვა კვლევების მიხედვით დადგინდა:

- KRR-ის დაბალი ანტიმუტაგენური აქტივობა;
- KRR და მისი აგლიკონი კემფეროლი ავლენენ MRP (190-kDa მრავლობითი წამლის რეზისტენტული ცილა) - ის ჯგუფის ძირითადი გამწოვი ტუმბოების ინჰიბირების უნარს ადამიანის მკერდის კიბოს MRP -ექსპრესირებული უჯრედებში.
- KRR-ს უმნიშვნელო ეფექტი Rhodamine 123-ის დაგროვებაზე სხვადასხვა წამალ-რეზისტენტულ, Colo 320 ადამიანის ნაწლავის კიბოდან გამოყოფილ MDR1 / LRP- უჯრედებში (Ugocsai et al., 2005).

1.3 ფლავონოიდების აბსორბცია, მეტაბოლიზმი და ბიომეღწევადობა

ბიოფლავონოიდების მოქმედების მექანიზმების და მათი პოტენციური როლის ამოსაცნობად სხვადასხვა დაავადების პრევენციისთვის, მეტად მნიშვნელოვანია იმ ფაქტორების ცოდნა, რომლებიც განსაზღვრავენ მათ გამოთავისუფლებას, ბიომეღწევადობის ხარისხს და ორგანიზმში მათ გარდაქმნას. ფლავანოიდების აბსორბციის, მეტაბოლიზმის და ბიოათვისების შესწავლა პასუხს გასცემს ყველა ამ კითხვას.

ფლავანოიდებიდან პირველად შესწავლილ იქნა ქვერცეტინი, როგორც ძირითადი საკვები ფლავანოლი. მცენარეებში ფლავანოიდების უმეტესი ნაწილი, გარდა კატეჩინებისა წარმოდგენილი არიან როგორც β-გლიკოზიდები. ეს

სტრუქტურული მახასიათებელი განსაზღვრავს საიდან არის შესაძლებელი მათი აბსორბირება წვრილი თუ მსხვილ ნაწლავიდან. დადგენილია, რომ ძირითადად გლუკოზიდები არიან ერთადერთი გლიკოზიდები რომლებიც შეიძლება შეწოვილ იქნენ წვრილი ნაწლავიდან, თუმცა გამონაკლისებიც აღწერილია. ამ ნაერთების აბსორბცია წვრილი ნაწლავიდან არის უფრო ეფექტური ვიდრე მსხვილი ნაწლავიდან და შესაბამისად პლაზმაში უფრო მაღალი კონცენტრაციით აღწევენ. წვრილი ნაწლავებიდან აბსორბციის შემდეგ ფლავონოიდები არიან კონიუგირებული გლუკურონის მჟავასთან ან სულფომჟავასთან ან შეიძლება მოხდეს მათი *O*-მეთილირება. კონიუგირების რეაქცია, რომელიც ხდება წვრილ ნაწლავში აბსორბციის შედეგად არის ძალიან ეფექტური და შედეგად ფლავონოიდის თავისუფალი აგლიკონი არ მოიპოვება პლაზმაში ან შარდში გარდა კატექინებისა.

ფლავონოიდების, რომლებიც წვრილი ნაწლავებიდან არ იწოვებიან და აბსორბირებული ფლავონოიდების, რომლებიც სეკრეტირდებიან ნაღვლით, დაშლა ხდება მიკროორგანიზმებით, რომლებიც შლიან ფლავონოიდების სტრუქტურას მსხვილ ნაწლავში. ამის შედეგად მიღებული ფენოლური მჟავები ნაწილობრივ იქნა დახასიათებული. ეს მჟავები შეიძლება აბსორბირებულ იქნენ და განისაზღვრონ რაოდენობრივად პლაზმასა და შარდში. ამიტომ, კვლევები მიიმართულია ფენოლური ნაერთების ქსოვილში განაწილების, უჯრედული ათვისების და უჯრედული მეტაბოლიზმის შესწავლისკენ (Hollman, 2004).

ფლავანოიდები არიან პოლიფენოლური ნივთიერებები, რომლებიც ფართოდ არიან გავრცელებულნი უმაღლეს მცენარეებში და აქედან გამომდინარე წარმოადგენენ ადამიანის ყოველდღიური საკვების ნაწილს (Gee et al., 2001). ფლავონოლ ქვერცეტინის (5,7,3',4'-hydroxyflavanol) გლიკოზიდები ყველაზე უხვად არიან წარმოდგენილი საკვებში ისინი გვხვდებიან მაღალი კონცენტრაციით ხახვში, ვაშლსა და ჩაიში (Hertog et al., 1993). 130-ზე მეტი წამლის ფორმაა რეგისტრირებული რომლებიც შეიცავენ ქვერცეტინს ან მის გლიკოზიდს მაგ. როგორცაა რუტინი (ქვერცეტინ-3-*O*-ბეტა-რუტინოზიდი). ამასთან, მსოფლიო მასშტაბით ამ პრეპარატების გაყიდვების მოცულობამ 430 მილიონი ამერიკული დოლარი შეადგინა 1998 წელს (Erlund et

al., 2000). ქვერცეტივით მდიდარ მცენარეულ ექსტრაქტებზე, რომელიც მიიღეს წიწიბურიდან და წითელი ღვინოდან, კლინიკური ეფექტურობა ორმაგ ბრმა, პლაცებო კონტროლირებად კვლევებში იქნა ნაჩვენები ქრონიკული ვენური უკმარისობის მკურნალობის დროს (Ihme et al., 1996; Kiesewetter et al., 2000). ფიტოთერაპიაში ფლავონოიდ გლიკოზიდები აგრეთვე მიიჩნევა ეფექტურ ნაერთებად, რომლებიც გამოიყენება ქვედა საშარდე გზების ინფექციების მკურნალობისთვის და ხშირად იყენებენ დასავლეთ ევროპის ქვეყნებში (De Smet and Brouwers, 1997).

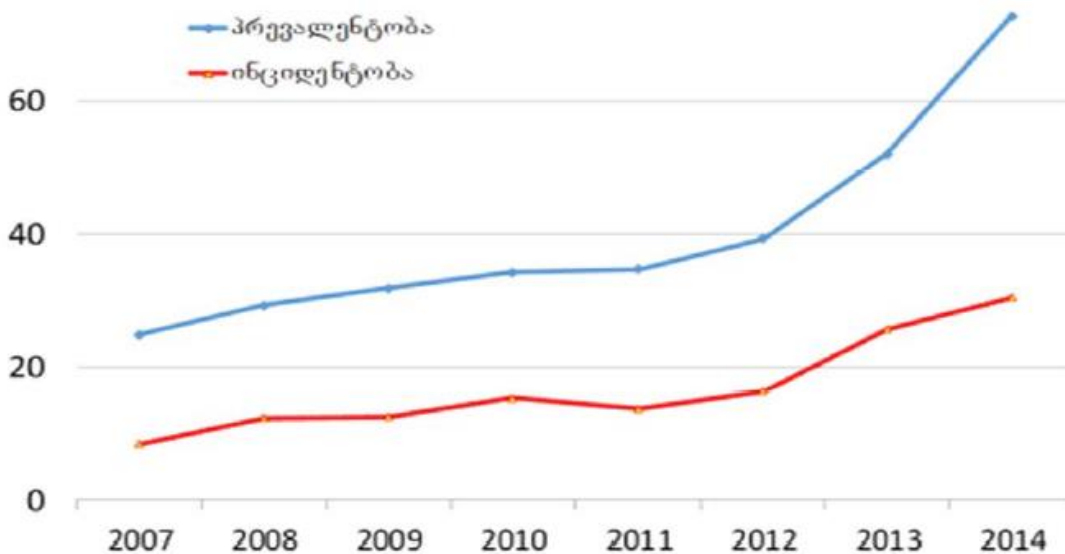
ქვერცეტინ გლიკოზიდის აბსორბცია ჯერ კიდევ არის დისკუსიის თემა. მრავალი წლის განმავლობაში მიიჩნეოდა, რომ ქვერცეტინ გლიკოზიდი უნდა ჰიდროლიზებულიყო აბსორბციამდე ნაწლავის ბაქტერიის მიერ და მხოლოდ ამის შემდეგ იყო ქვერცეტინის აგლიკონი სისტემურად ხელმისაწვდომი. ამრიგად, კვლევები ქვერცეტინის ბიოლოგიურად აქტიურობაზე ორიენტირებულია ძირითადად მის აგლიკონზე. *In vitro* ცდებში ნაჩვენები იყო, რომ მათ გააჩნიათ თავისუფალი რადიკალების შებოჭვის უნარი, მრავალი ბიოქიმიური და ფარმაკოლოგიური ეფექტი, როგორცაა ანტიოქსიდანტური, ანტიკოაგულაციური, ანთების საწინააღმდეგო თუ ანტიკანცეროგენული აქტიურობა (Middleton and Kandaswami, 1993).

თანამედროვე ეტაპზე, მრავალი ეპიდემიოლოგიური და კლინიკური მონაცემების საფუძველზე, ავადობისა და სიკვდილიანობის სტრუქტურაში მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია გულის იშემიური დაავადებისა და თირკმლის ქრონიკული დაავადებისგან გამოწვეულ გართულებებს. საკითხის აქტუალობას დიდად განაპირობებს ის ფაქტიც, რომ ეს ორი დაავადება ხშირად ერთმანეთის თანმხლებია, ამიტომ პაციენტის მდგომარეობას. პათოგენეზურად, გულ-სისხლძარღვთა სისტემის, ისევე როგორც თირკმლის ქრონიკული დაავადებების ურთიერთგანპირობებულობა მიჩნეულია როგორც მიზეზად, ასევე შედეგად.

თირკმლის ქრონიკული დაავადება (თქდ) არის მსოფლიო მასშტაბის ჯანმრთელობის პრობლემა, რომელსაც მწვავე სოციალური და ეკონომიკური მნიშვნელობა აქვს. ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით, 2012 წელს მსოფლიოში აღირიცხა შარდ-სასქესო სისტემის დაავადებებით გარდაცვალების 1 196

000 შემთხვევა, რაც საერთო სიკვდილიანობის 2.1% შეადგენს. შარდ-სასქესო სისტემის დაავადებებით გარდაცვალების შემთხვევათა უდიდესი წილი მოდის თირკმლის დაავადებებზე. 2012 წელს მსოფლიოში აღირიცხა თირკმლის დაავადებებით გარდაცვალების 864 000 შემთხვევა, რაც საერთო სიკვდილიანობის 1.5%-ს შეადგენს.

შარდ-სასქესო სისტემის დაავადებათა სტრუქტურაში გამორჩეული მნიშვნელობა აქვს თირკმელების უკმარისობით მიმდინარე დაავადებებს მაღალი ლეტალობიდან და დანახარჯებიდან გამომდინარე. საქართველოში ამ დაავადების პრევალენტობა 2007-2014 წლებში მუდმივად მზარდია და 2007 წლთან შედარებით თითქმის გასამმაგდა. განსაკუთრებით მკვეთრი იყო პრევალენტობის ზრდა 2014 წელს (1.4-ჯერ). 2007-2014 წლებში თირკმელების უკმარისობით მიმდინარე დაავადების ინციდენტობა გაიზარდა 3.6-ჯერ (სქემა 1.5).



სქემა 1.5. თირკმლის უკმარისობის სტატისტიკური მაჩვენებლები, საქართველო 2007-2014.

საკმაოდ ხშირია გულ-სისხლძარღვთა სისტემისა და თირკმლის ქრონიკული დაავადებების კომბინაცია. ეს მდგომარეობა საკმაოდ საყურადღებოა, ვინაიდან ამ დროს პაციენტის მდგომარეობას უფრო მეტად ართულებს გულის პათოლოგია, ვიდრე

თირკმლის და ხშირად პაციენტი გულის იშემიური დაავადების გართულებით იღუპება.

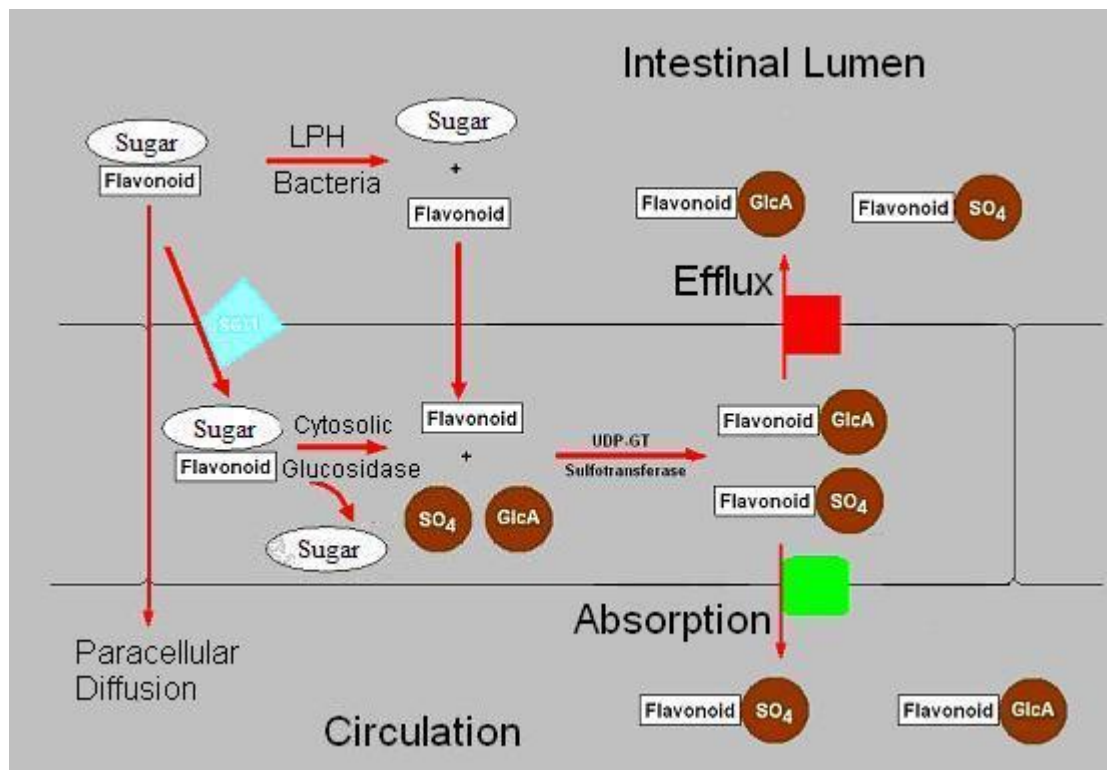
საქართველოში თირკმლების ქრონიკულ დაავადებით შეპყრობილ პაციენტთა რაოდენობის შეფასება შესაძლებელია მხოლოდ იმ პაციენტთა მიხედვით, რომლებიც მიმართავენ ნეფროლოგიურ კლინიკებს. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით ყოველწლიურად თქვდ შეპყრობილ ახალგამოვლენილ პაციენტთა რაოდენობა აღწევს 480-520, რაც 1 მლნ მოსახლეზე შეადგენს 120-160 პაციენტს. ამათგან, თირკმლის უკმარისობის ტერმინალურ სტადიაზე მყოფი, რომლებიც გადაუდებლად საჭიროებს თირკმლის ჩანაცვლებითი თერაპიისათვის მომზადებას, არის 160-200 ანუ 1 მლნ მოსახლეზე ყოველწლიურად მოდის 40-50 პოტენციურად სადიალიზო პაციენტი. 2005 წლის მონაცემებით თირკმლის ჩანაცვლებით თერაპიაზე იმყოფება (ჰდ, პდ, თირკმელგადანერგილები) 609 პაციენტი ანუ 200 1 მლნ მოსახლეზე. ეპიდემიოლოგიური კვლევის შედეგებით თირკმლების ქრონიკული დაავადებით შეპყრობილ პაციენტთა რაოდენობა მნიშვნელოვნად გაიზარდება, რაც აიხსნება დროულად გამოუვლენელი შაქრიანი დიაბეტის, ჰიპერტონიისა და პროტეინურიის არსებობით; ასევე მხედველობაშია მისაღები თირკმლის ის ქრონიკული დაავადებები, რომლებიც ვითარდება მეორადად მრავალი სხვა დაავადების ფონზე (კარდიოვასკულური, რევმატოლოგიური, ჰემატოლოგიური და სხვ.).

მიუხედავად იმისა, რომ არსებობს ძლიერი მტკიცებულება ადამიანების ჯანმრთელობისთვის ფლავონოიდების მოხმარების მარგებლობაზე, ჯერ კიდევ არ არის სრულად შესწავლილი რომელი ფლავანოიდი არის აბსორბირებული და რა მექანიზმები არის ჩართული. მრავალმა კვლევამ აჩვენა, რომ ქვერცეტინ 4'-β-გლუკოზიდი, რომელიც ფლავონოიდების დომინანტური ფორმაა არ იწოვებოდა ნაწლავის ეპითელარულ უჯრედებში (Caco-2). ამ კვლევების მიზანი იყო იმ ჰიპოთეზის შემოწმება, რომლის მიხედვითაც სპეციფიური ეფლუქს ტრანსპორტერები არიან პასუხისმგებლნი ქვერცეტინის არასრულ აბსორბციაზე.

ფლავონოლ გლიკოზიდებმა აჩვენეს, როგორც ძალიან მაღალი, ისე ძალიან დაბალი აბსორბციის უნარი. დრო მაქსიმალური კონცენტრაციის მიღწევისთვის (T_{max})

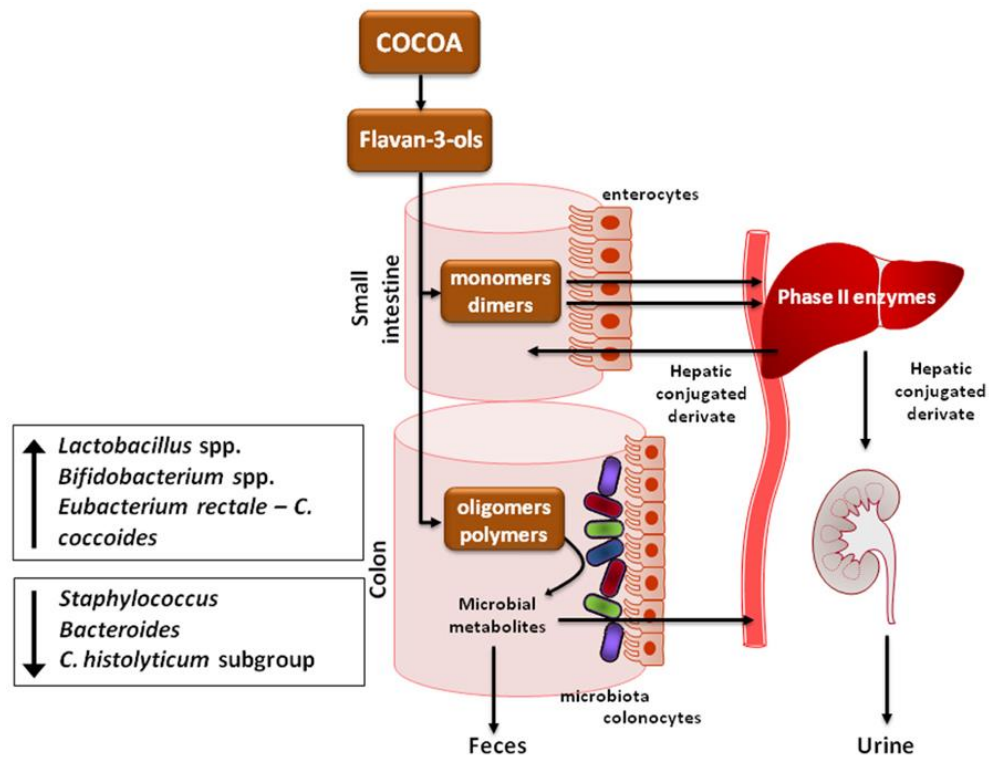
იყო <0.5 და 9 სთ-ს შორის ინტერვალში. ხახვიდან მიღებული გლუკოზიდ ქვერცეტინის ბიოშელწევადობა იყო ყველაზე მაღალი. ვაშლიდან მიღებული სხვადასხვა გლუკოზიდ ქვერცეტინის (β-გალაქტოზიდების და β-ქსილოზიდების) და სუფთა ქვერცეტინ რუტინოზიდის ბიოშელწევადობა კი იყო მხოლოდ ხახვიდან მიღებულის 30% (Hollman et al., 1997).

ამგვარად, ქვერცეტინ გლუკოზიდის შაქროვანი ნაწილი, როგორც ჩანს არის მათი ბიოათვისების მნიშვნელოვანი განმსაზღვრელი, რაც აგრეთვე დადასტურდა კვლევებით, როდესაც ჯანმრთელი მოხალისეების მიერ ხდებოდა სუფთა ქვერცეტინ-β-გლუკოზიდის ან ქვერცეტინ-β-რუტინოზიდის მიღება (Hollman et al., 1999). გლუკოზიდის მიღების შემდეგ პლაზმაში ქვერცეტინის კონცენტრაციის პიკი (Cmax) იყო 20-ჯერ უფრო მაღალი და Tmax 10 - ჯერ უფრო სწრაფი ვიდრე რუტინოზიდის მიღების შემდეგ (სურათი1.1.) (Maciej et al., 2015).



სურათი 1.1. ფლავონოლ გლიკოზიდების აბსორბცია

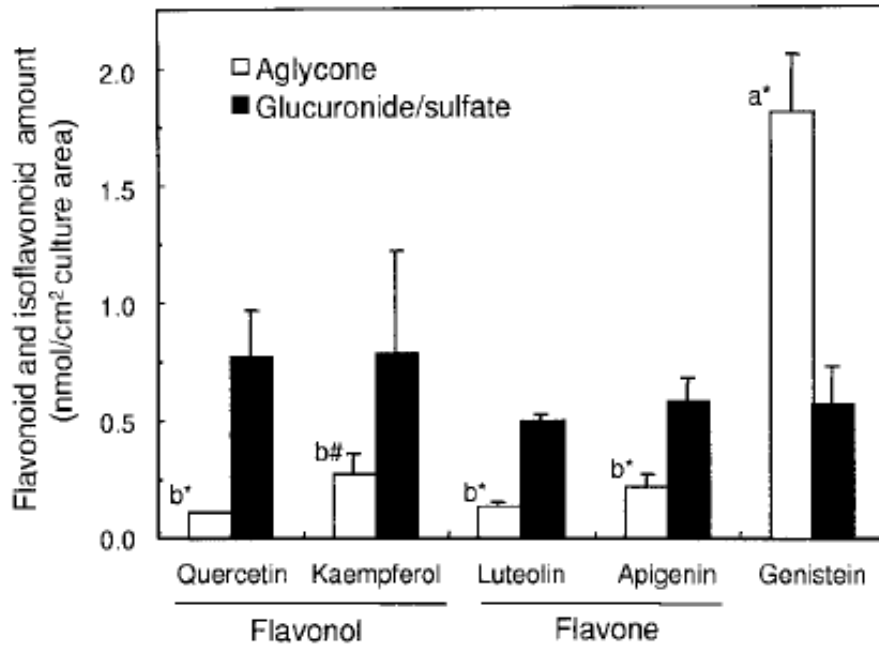
per os გზით მიღებული უმეტესი ნივთიერებების აბსორბცია და მეტაბოლიზმი იწყება კუჭ-ნაწლავის ტრაქტიდან (GI). ფლავანოიდებისათვის მეტაბოლიზმის მნიშვნელოვანი ადგილებია კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის სანათური, ნაწლავის კედლის უჯრედები და ღვიძლი (სურათი 1.2). ქვერცეტინის აბსორბცია და მეტაბოლიზმი ნაჩვენებია იქნა ადამიანის კუჭ-ნაწლავის უჯრედული მოდელის (Caco-2) გამოყენებით (Ikeno et al., 1999). ანალოგიურად, ქვერცეტინ -4'-გლუკოზიდი ტრანსპორტირდება Caco-2 უჯრედების შრეებში, თუმცა გამოიღვენება უჯრედებიდან სეკრეტორული ცილის-მრავლობითი მედიკამენტური რეზისტენტული ცილა 2(MRP-2)-ის მეშვეობით (Walgren et al., 2000). მიუხედავად იმისა, რომ იყო ქვერცეტინ გლიკოზიდის პლაზმაში ანალიზის მცდელობები მას-სპექტომეტრის ან მაღალ ეფექტური სითხოვანი ქრომატოგრაფიის (HPLC) გამოყენებით, რთული აღმოჩნდა მისი განსაზღვრა იმის გამო, რომ ფლავონოიდ გლუკურონიდების და გლიკოზიდების შეკავების დრო მსგავსია ისევე, როგორც მათი არასპეციფიური ულტრაიისფერი სპექტრები (Manach et al., 1998;Nielsen and Dragsted, 1998; Wittig et al., 2001; Arts et al., 2002).



სურათი 1. 2. ფლავანოიდებისათვის მეტაბოლიზმის მნიშვნელოვანი საფეხურები

იზოფლავონოიდები იპყრობენ დიდ ყურადღებას თავიანთი ესტროგენული აქტივობის გამო. იზოფლავონოიდების ნაწლავებში აბსორბციის შესწავლისთვის გამოკვლევულ იქნა გენისტეინის და დაიციენის და მათი გლიკოზიდების უჯრედული ათვისება და მეტაბოლიზმი, ადამიანის ნაწლავის ეპითელიუმის მოდელზე ერთშრიანი Caco-2 უჯრედების გამოყენებით. როდესაც მოხდა Caco-2 შრეების აპიკალურ მხარეს გენისტეინის ან დაიციენის აპლიკაცია 10 მოლი/ლ კონცენტრაციით, აღმოჩნდა, რომ ორი საათის განმავლობაში ინკუბაციის შემდეგ აგლიკონის დეტექტირება ვერ მოხდა აპიკალურ ხსნარში და დაფიქსირდა მხოლოდ გლუკურონიდები / სულფატები 1-2 მოლი/ლ ოდენობით, ხოლო ბაზოლატერალურ სეროზულ ხსნარში განისაზღვრა ორივე - აგლიკონი და გლუკურონიდ/სულფატი, რომლთა რაოდენობა დროსთან მიმართებაში იზრდებოდა და მიაღწია საწყისი დოზის 15-20%-ს. გენისტეინის და დაიციენის გლიკოზიდების ტრანსპორტი Caco-2 უჯრედების მონოშრის გავლით იყო უფრო ნაკლები ვიდრე მათი აგლიკონების. გენისტეინის უჯრედული მეტაბოლიზმი შედარებულ იქნა ქვერცეტიტთან, კემფეროლთან, ლუტეოლინთან და აპიგენინთან. მხოლოდ გენისტეინის აგლიკონი იქნა უცვლელად ტრანსპორტირებული ბაზოლატერალურ ხსნარში და უფრო დიდი რაოდენობით ვიდრე სხვა ფლავანოიდის აგლიკონები, ამასთან ტრანსეპითელიალური რეზისტენტობის შემცირების გარეშე.

ლიპოსომური მემბრანის მიმართ აფინურობა იცვლება შემდეგნაირად გენისტეინი = დაიციენი < დაიციენი < გენისტეინი << ფლავონოიდ აგლიკონები. ამ შედეგების მიხედვით მტკიცედ შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ იზოფლავონების აგლიკონების ათვისება ენტეროციტებში უფრო მაღალია ვიდრე მათი გლიკოზიდების, რადგან ისინი ხასიათდებიან ზომიერი ლიპოფილურობით (J. Nutr. 132: 1956–1961, 2002) (სქემა 1.6).



სქემა 1.6. იზოფლავონოიდების გლიკოზიდების და მათი აგლიკონის ათვისება ენტეროციტებში

მკერდის კიბოს - რეზისტენტული ცილა (BCRP), იგივე ABCG2, ანტიკანცეროგენულ აგენტებს ანიჭებს რეზისტენტობას (Yang et al., 2012). ზოგიერთი გლიკოლიზირებული ფლავონოიდი, როგორცაა ნარიგენინ - 7 - გლიკოზიდი ეფექტურად აინჰიბირებს ABCG2-ს, რის გამოც მას აქვს ორი მნიშვნელოვანი კლინიკური შედეგი:

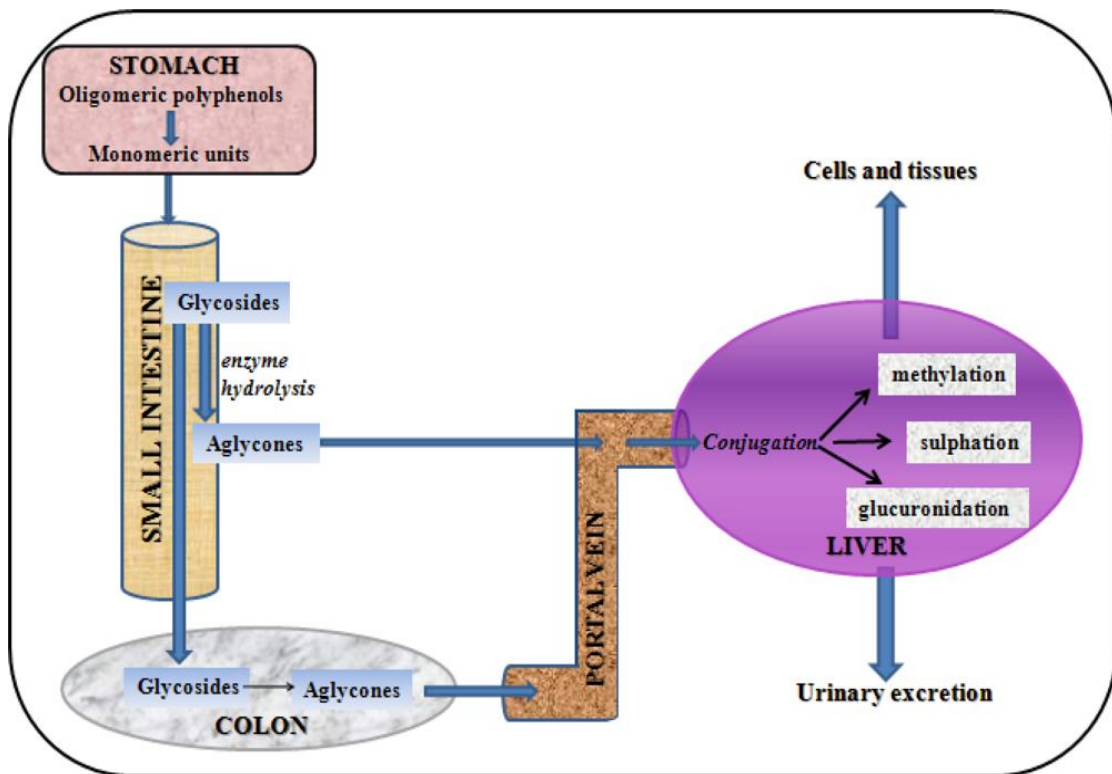
1. ფლავონოიდები და გლიკოლიზირებული ფლავონოიდები შეიძლება იყოს მნიშვნელოვანი ნივთიერებები სიმსივნურ უჯრედებში ABCG2-ის მეშვეობით წამლების რეზისტენტობის დაძლევაში.
2. ფლავონოიდების და ABCG2-ის ერთობლივი ზემოქმედება ზრდის ანტიკანცეროგენულ ეფექტს.

ფლავონოიდ ქვერცეტილის და კემფეროლის მეტაბოლიზმი ვირთაგვების ჰეპატოციტებში გამოკვლეულ იქნა სითხოვანი ქრომატოგრაფიისა და მასსპექტრომეტრის გამოყენებით (Berger et al., 2012). ქვერცეტინი და კემფეროლი

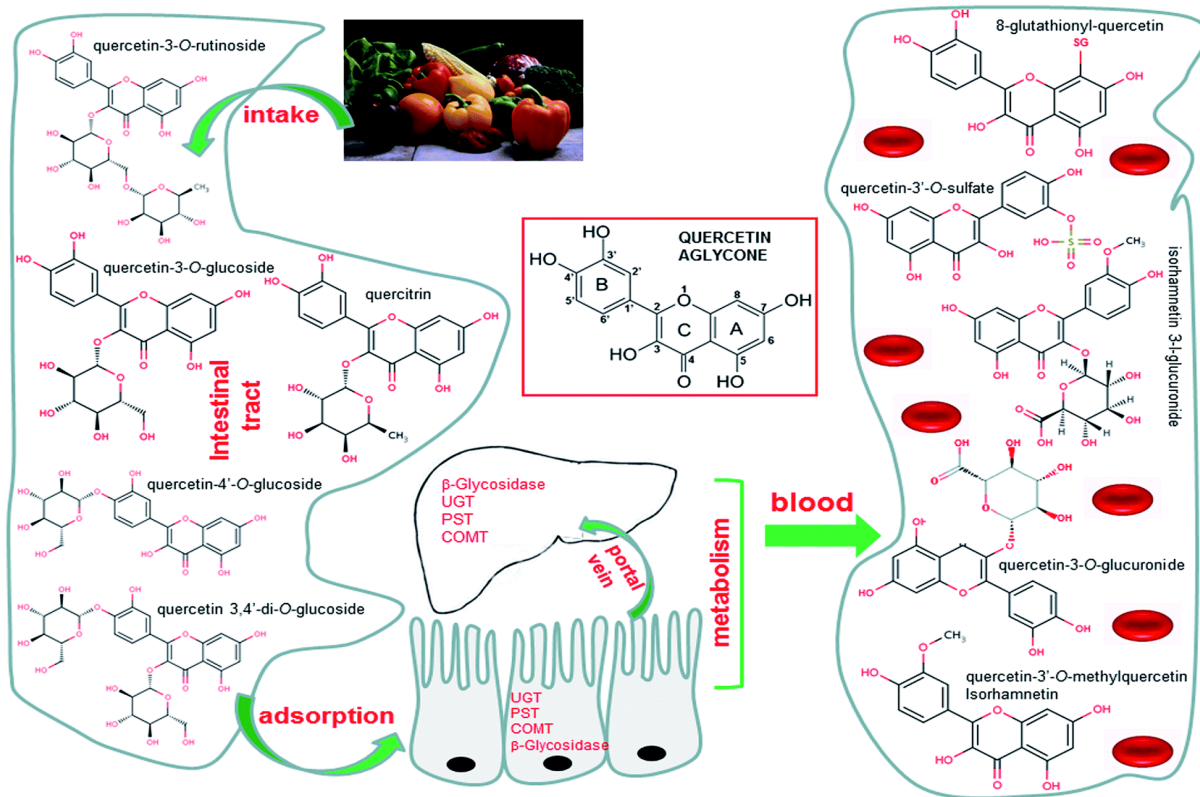
ინტენსიურად მეტაბოლიზდა და ქვერცეპტინის ოთხი და კემფეროლის ორი გლუკურონიდი იქნა აღმოჩენილი ინკუბაციის შემდეგ (Boonpawa et al., 2015).

როდესაც მსჯელობენ ფლავონოიდების ბიოლოგიურ აქტიურობაზე აუცილებლად მხედველობაში უნდა იქნეს მიღებული მათი მეტაბოლიზმის მნიშვნელოვანი ასპექტები: ფლავონოიდ გლიკოზიდები პირველ რიგში ჰიდროლიზდებიან და ხდება აგლიკონის გამოთავისუფლება, რომელიც შემდეგ შეიწოვება. ფლავონოიდების მეტაბოლიზმი მოიცავს მეთილირების, სულფირების, გლუკურონიზაციისა და ჟანგვა აღდგენის რეაქციებს (სურათი 1.3; 1.4) (Oliveira et al., 2002).

რადგან, ფლავონოიდური ნაერთების კლინიკური გამოყენების ასპექტები მრავალფეროვანი და მნიშვნელოვანია, სწორედ ამიტომ ძალიან მნიშვნელოვანია მათი აბსორბციის, ბიომეღწევადობისა და მეტაბოლიზმის სრულყოფილი შესწავლა.



სურათი 1.3. ფლავონოიდების მეტაბოლიზმი

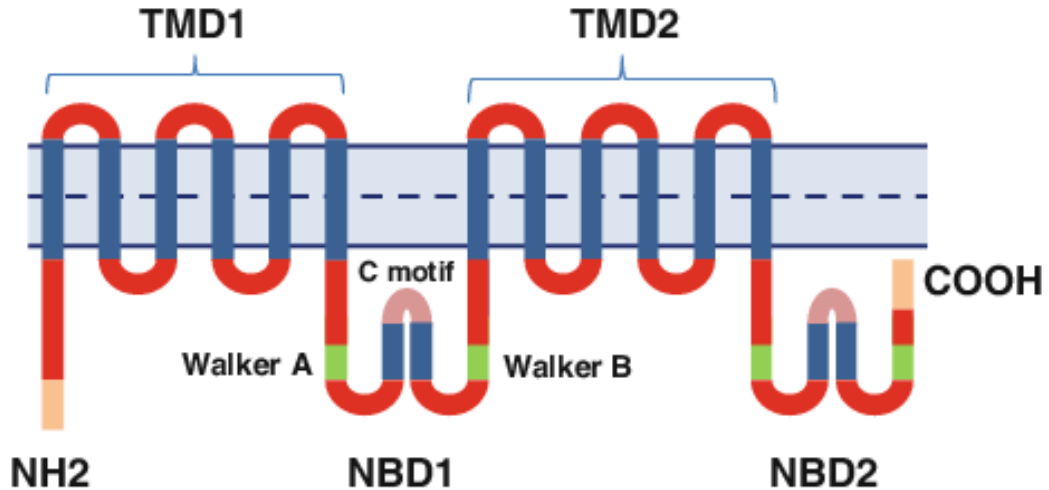


სურათი 1.4. ქვერცეტინის მეტაბოლიზმი

1.4 P-გლიკოპროტეინების მოკლე დახასიათება

არსებობს უამრავი ფაქტორი, რომელმაც შეიძლება გავლენა იქონიოს პერორალურად მიღებული წამლის აბსორბციის პროცესზე. ნაწლავური ტრანსპორტერები ძალიან დიდ როლს თამაშობენ წამლის აბსორბციაში. ეს ტრანსპორტერები იყოფა 2 ძირითად კლასად: გახსნილი ნივთიერების გადამტანებად და ატფ-დაკავშირებულ კასეტებად (ABC). P-გლიკოპროტეინები (P-გპ) ეკუთვნის ABC ტრანსპორტერების ოჯახს, რომელსაც უჯრედიდან გამოაქვს სამკურნალო საშუალების სუბსტრატი, რითაც რეგულირდება პრეპარატის ნაწლავური შეწოვა (Barta et al., 2008). P-გლიკოპროტეინები თავდაპირველად აღმოაჩინეს 1976 წელს, Juliano და Ling-მა, როგორც გამწოვი ტუმბო. P-გპ არის 170 კილოდალტონი მასის მქონე ცილა.

ადამიანის P-გპ შედგება 1280 ამინომჟავისგან, სადაც ყოველი N და C-ტერმინალური 610 ამინომჟავა არის ორგანიზებული 6-ჰიდროფობური ტრანსმემბრანული დომენების სახით, რომელსაც მოყვება ჰიდროფილური ნუკლეოტიდაკავშირებული დომენი. ეს 2 ნახევარი ერთმანეთს უკავშირდება 60 ამინომჟავისგან შემდგარი დამაკავშირებელი რეგიონის საშუალებით (Zhou 2008). იხ. სურათი 1.5.

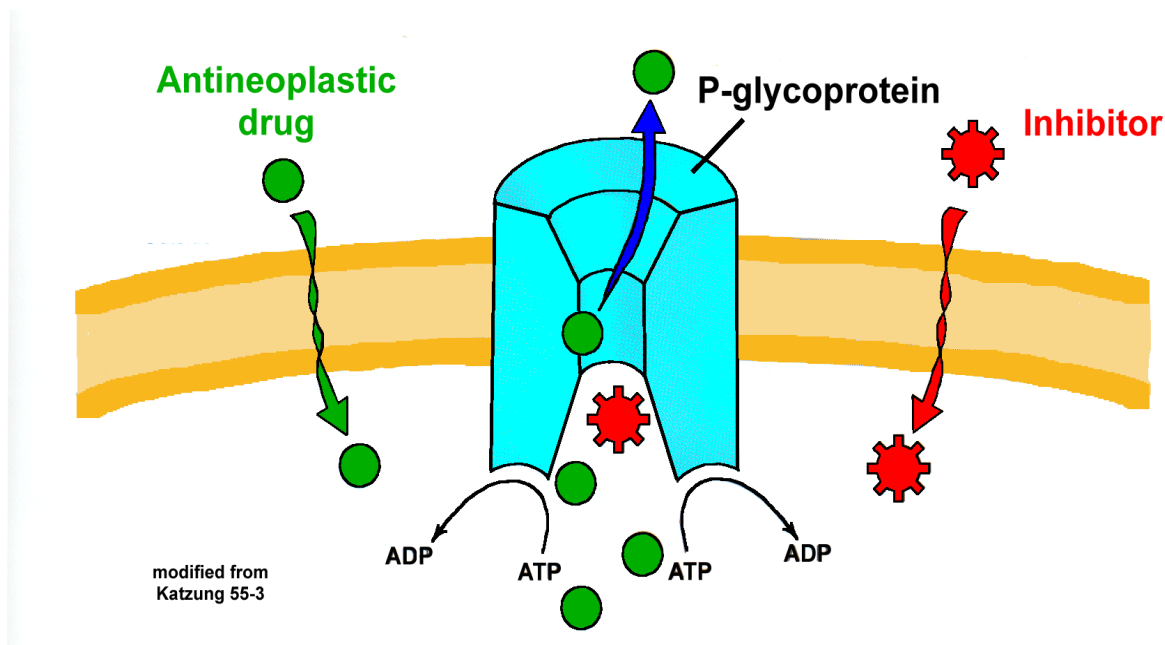


სურათი 1.5. P-გპ სტრუქტურა

სურათ 1.6.-ზე ნათლად ჩანს წამლის ტრანსპორტირების მექანიზმი P-გპ-ის საშუალებით.

მედიკამენტებს ან სუბსტრატებს შეუძლიათ უჯრედის მემბრანაში შეაღწიონ მარტივი დიფუზიის, ფილტრაციის ან სპეციალური ტრანსპორტერების საშუალებით. წამლის გაწოვის პირველი ნაბიჯი იწყება P-გპ-ის მიერ წამლის ამოცნობით, რასაც მოყვება ატფ-დაკავშირებული ჰიდროლიზი და ასევე შემდგომი ჰიდროლიზი. საბოლოოდ, დაგროვებული ენერგია გამოიყენება უჯრედის მემბრანის გარეთ სუბსტრატის გაწოვისთვის ცენტრალური ფორების გავლით.

P-გპ არის ყველაზე ფართოდ გავრცელებული ტრანსპორტერი, რომელიც არის სხვადასხვა წამალ-რეზისტენტულ სიმსივნურ უჯრედებში და სხვადასხვა ორგანოებში, მათ შორის ნაწლავებში, ღვიძლში, თირკმელებში, პლაცენტაში, ჰემატოენცეფალურ ბარიერში.



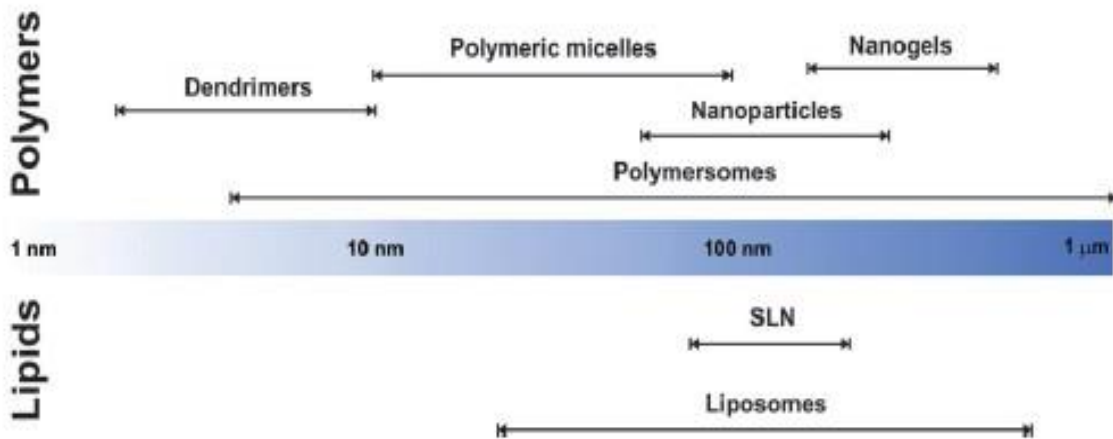
სურათი 1.6. P-gp-ის მოქმედების მექანიზმი

ცნობილია, რომ P-gp განლაგებულია Caco-2 უჯრედების აპიკალური მემბრანაში და ნაწლავის ლორწოვან (აპიკალურ) ზედაპირზე. იგი წარმოადგენს უმთავრეს ბარიერს პერორალურად მიღებული მრავალი სტრუქტურულად განსხვავებული წამლისათვის (Oostendorp et al., 2009). სხვა მრავალ სატრანსპორტო ცილებთან შედარებით, რომლებიც გარკვეულ ქიმიურ სუბსტრატებს ამოიცნობენ, P-gp უჩვეულოა, რადგანაც მათ გამოაქვთ მთელი რიგი ლიპოფილური და კათიონური ნაერთები პოლიფენოლების ჩათვლით (Thilakarathna et al., 2013).

1.5 ნანოტექნოლოგია და მცენარეული პრეპარატები

ბოლო წლებში, მნიშვნელოვანი წინსვლები მიღწეულ იქნა ნანოტექნოლოგიის სფეროში, განსაკუთრებით საბუნებისმეტყველო მეცნიერებასა და მედიცინაში. კერძოდ, პრეპარატებს რომელთა დამზადების მიზნით გამოიყენება ნანოტექნოლოგიები ჩვეულებრივ უწოდებენ ნანოპრეპარატებს (Brambilla et al., 2011).

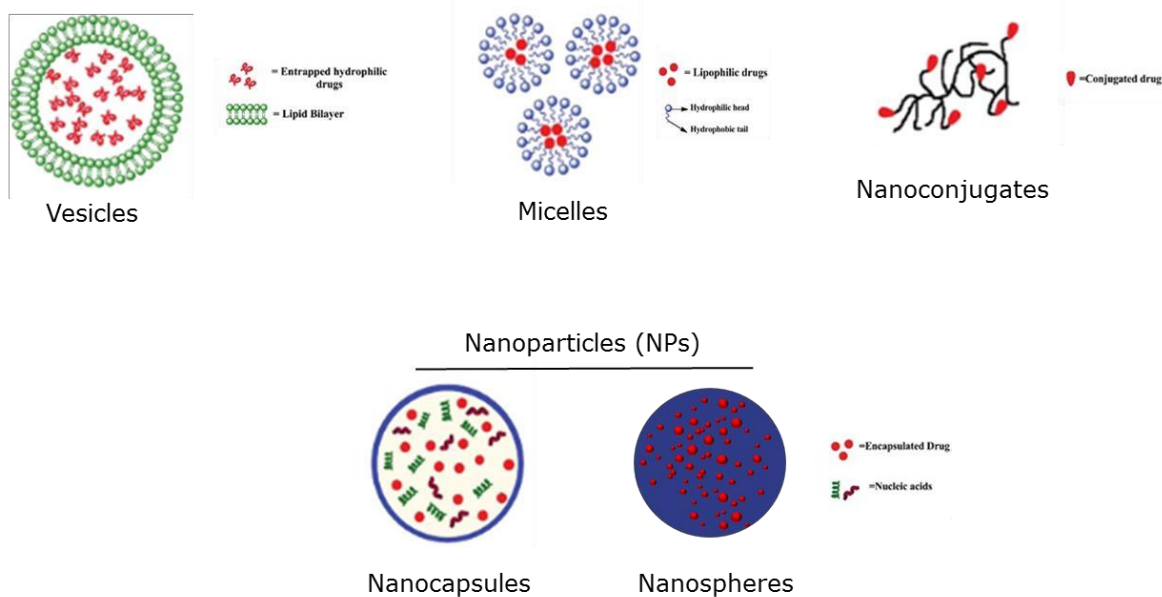
სხვადასხვა აქტიური ნივთიერებებით შევსებული ნანომატარებლების ზომა ჩვეულებრივ 1-დან 1000 ნმ-მდეა. ბიოსამედიცინო სფეროში წარმოდგენილია განსხვავებული სახის ნანო-სისტემები, რომლებიც შედგება სხვადასხვა მასალისაგან, მაგ. ლიპიდები, პოლიმერები და არაორგანული ნაერთები; შედეგად, წამლის ორგანიზმში მიწოდების სისტემების სხვადასხვა მიზნით გამოყენება დამოკიდებულია მათ ფიზიკურ-ქიმიურ თვისებებზე (სქემა 1.7).



სქემა 1.7. ლიპიდების და პოლიმერების ფუძეზე არსებული ნანო-ნაწილაკების სისტემები, რომლებიც წამლის მიზანმიმართული მიწოდებისთვის გამოიყენება.

წამლის მიწოდების ტექნოლოგიებში, ნანომატარებლები შექმნილია (I) იმისთვის, რომ დაიცვან წამლები *in vivo* დეგადაციისგან; (II) გაძლიერდეს წამლის შეწოვა ეპითელიუმში ადვილად განაწილების გზით; (III) მოხდეს ფარმაცოკინეტიკის და წამლის ქსოვილებში განაწილების შეცვლა; (IV) გაუმჯობესდეს უჯრედში შეღწევადობა და უჯრედშორის განაწილება. გარდა ამისა, ფარმაცევტული ნანო-მატარებლების ზედაპირის მოდიფიკაცია გამოიყენება მათი ორგანიზმში გადაადგილების კონტროლისთვის. ასეთი მოდიფიკაციების ყველაზე მნიშვნელოვანი შედეგები მოიცავს სისხლის მიმოქცევის სისტემაში ნანომატარებლების

სტაბილურობის და ნახევარდაშლის პერიოდის გაზრდას, სამიზნე პათოლოგიურ ზონაზე პასიურ ან აქტიურ შეტევას და ადგილობრივ მასტიმულირებელზე რეაგირებას, როგორცაა pH და/ან ტემპერატურის ადგილობრივი პათოლოგიური ცვლილებები. ამ სფეროში, ბიოდეგადირებადი პოლიმერები ფართოდ გამოიყენება იმის გამო, რომ ისინი განიცდიან ქიმიურ ან ფერმენტულ დაშლას წყალში ხსნად დაბალმოლეკულურ ნაერთებად, რომლებიც მონაწილეობას იღებენ ორგანიზმის ნორმალურ მეტაბოლურ პროცესში (Sonaje et al., 2010). წამლის მიწოდებისთვის ყველაზე ხშირად გამოყენებული პოლიმერის ფუძეზე არსებული ნანონაწილაკების სისტემებია მყარი ნანონაწილაკები, ვეზიკულები, პოლიმერული მიცელები და ნანოკონიუგატები (სქემა 1.8) (Couvreur et al., 2006).



სქემა 1.8. პოლიმერული ნანოპლათფორმები წამლის მიწოდებისთვის

მიცელები არიან თვითორგანიზებული ნანოზომის კოლოიდური ნაწილაკები, რომლებიც ფორმირდებიან სპონტანურად გარკვეული კონცენტრაციებისა და ტემპერატურის პირობებში, ამფიფილური ან ზედაპირულად აქტიური მოლეკულებიდან, რომელიც შედგება ორი მკაფიოდ განსხვავებული რეგიონისგან,

საპირისპირო ავინობით მოცემული გამხსნელის მიმართ (Gaucher et al., 2010). ამფიფილური მოლეკულების ჰიდროფობური სეგმენტები მიცელის ბირთვს ქმნის, მაშინ როცა ჰიდროფილური ფრაგმენტები ქმნის მიცელის გარსს. როდესაც მიცელებს იყენებენ წყალხსნარებში როგორც წამლის გადამტანებს, მათ ბირთვში იხსნება ცუდად ხსნადი და არაპოლარული მოლეკულები.

არსებობს ნანოგადამტანი სისტემის ძირითადი ორი ტიპი:

1. ნანოსფეროები - მყარი ნაწილაკებია, რომლებიც დაფარულნი არიან ნანოზომის მემბრანით, რომლებიც შეიცავენ წამალს შიდა მატრიცაში ან სფეროს ზედაპირზე.

2. ნანოკაფსულები – ვეზიკულარული სისტემაა, რომელშიც მოთავსებულია წამალი, როგორც ცენტრალური ბირთვი და შემოსაზღვრულია პოლიმერული გარსით.

ფართოდ გამოიყენება დენდრიმერები - მიკრო და ნანო მინიატურული კაფსულები, როგორც წამლის ორგანიზმში მიწოდების სისტემა მიზნობრივი გადატანისთვის. დენდრიმერები დატოტვილი მოლეკულები არიან ღრმულებით.

ნებისმიერი პრეპარატის, რომელიც შეიძლება მიღებულ იქნეს მცენარეთა, ცხოველების, ზღვის ან სინთეზური ნედლეულისაგან, თერაპიული ეფექტურობა დამოკიდებულია დოზირებული ფორმის უნარზე მოახდინოს პრეპარატის მიწოდება მისი მოქმედების ადგილზე საკმარისი სიჩქარით და რაოდენობით, იმისათვის რომ გამოიწვიოს სასურველი ფარმაკოლოგიური ეფექტი. დოზირებული ფორმის ამ მახასიათებელს ეწოდება ბიოშელწევადობა (Scheepens et al., 2010). მედიკამენტების უმეტესობისთვის, ფარმაკოლოგიური ეფექტი შეიძლება პირდაპირ კავშირში იყოს პლაზმაში მათ რაოდენობასთან. აქედან გამომდინარე, ტერმინი ბიოშელწევადობა განისაზღვრება, როგორც დოზირებული წამლის ფორმიდან უცვლელი სახით გამოთავისუფლებული ნივთიერების შეწოვის სიჩქარისა და მოცულობის მაჩვენებელი. ზოგჯერ, სწრაფი შეწოვა სასურველია, როდესაც საჭიროა წამლის მოქმედების დაუყოვნებლივი დაწყება მაგ. მწვავე მდგომარეობის მკურნალობისათვის, როგორცაა ასთმის შეტევა, ტკივილი და სხვა. ხოლო, აბსორბციის ნელი ტემპი საჭიროა, როდესაც სასურველია წამლის მოქმედების გახანგრძლივება ან არასასურველი

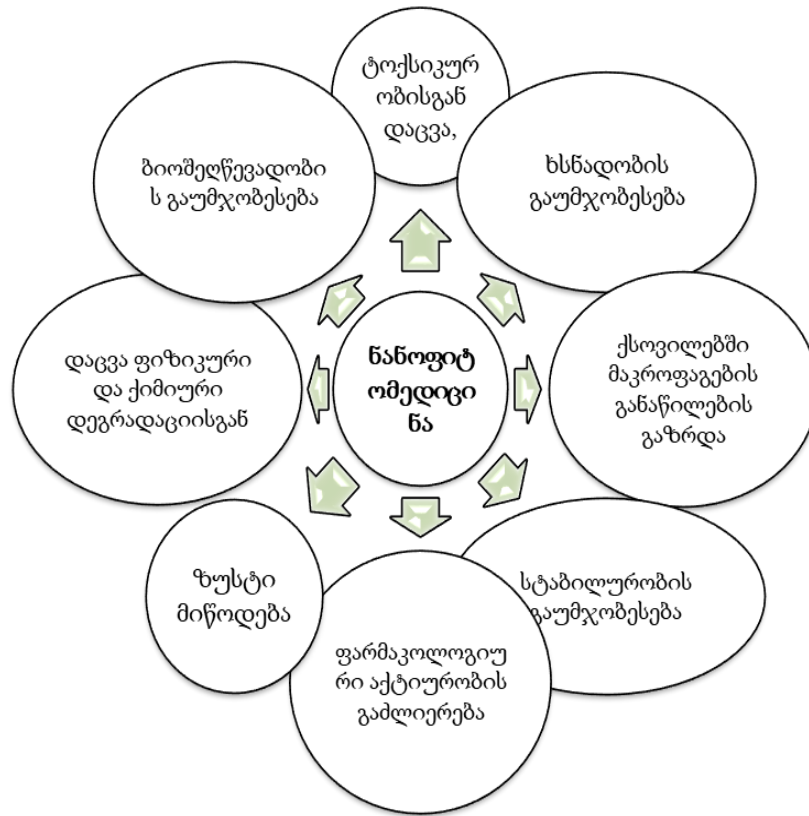
ეფექტის დაძლევა და შეწოვის მოცულობის კონტროლი, რაც ძალიან მნიშვნელოვანია ქრონიკული დაავადებების მკურნალობაში, მაგ. როგორცაა ჰიპერტენზია, ეპილეფსია და სხვა. ეს ყველაფერი შეიძლება მიღწეულ იქნას სამკურნალო ნივთიერების ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შეცვლით და დოზირებული ფორმის მახასიათებლებით (Huang 2009).

მცენარეული პრეპარატები უძველესი დროიდან გამოიყენებოდა და მცენარე იყო ძირითადი წყარო სამკურნალო საშუალებების მისაღებად. დღესდღეობით, ღირებული მედიკამენტების 50% ბუნებრივი წყაროებიდან არის მიღებული. ფიტოპრეპარატების გამოყენება გაიზარდა, რადგან მათ აქვთ უკეთესი თერაპიული მოქმედება და ნაკლები გვერდითი ეფექტები ალოპათიურ პრეპარატებთან შედარებით, რაც კარგად არის ჩამოყალიბებული სხვადასხვა ფიტოქიმიურ და ფარმაკოლოგიურ კვლევებში. ფიტოპრეპარატებმა გამოავლინეს მაღალი თერაპიული ეფექტურობა in-vitro კვლევებში, მაგრამ ნაკლები in-vivo ეფექტურობა წყალში ცუდად ხსნადობის, ლიპოფილურობის და შეუსაბამო მოლეკულური ზომის გამო. შედეგად, დაბალი აბსორბციის უნარი და შესაბამისად ცუდი ბიოშელწევადობა ახასიათებთ. ფიტოპრეპარატების ბიოფარმაციის და ფარმაკოკინეტიკის უკეთ შესწავლა ასევე მნიშვნელოვანია რაციონალური დოზირების რეჟიმის განსაზღვრისთვის.

ნანოტექნოლოგია წარმოადგენს მედიცინისა და ფარმაცევტული დარგის რევოლუციურ მიდგომებს. სამედიცინო მომსახურების სხვადასხვა სფერო უკვე სარგებლობს ნანოტექნოლოგიის უპირატესობით.

ნანოტექნოლოგიის გამოყენება მკურნალობისთვის, იდენტიფიკაციისთვის, მონიტორინგისა და ბიოლოგიური სისტემების მართვისთვის მოიხსენიება როგორც ნანომედიცინა. მცენარეული სამკურნალო ფორმების შესწავლით დადასტურდა, რომ ნანო-ფუძეზე მათ დატანას აქვს ფიტომედიცინისთვის მთელი რიგი ისეთი უპირატესობები, როგორცაა ხსნადობის და ბიოშელწევადობის გაუმჯობესება, ტოქსიკურობისგან დაცვა, ფარმაკოლოგიური აქტიურობის გაძლიერება, სტაბილურობის გაუმჯობესება, ქსოვილებში მაკროფაგების განაწილების გაზრდა, ზუსტი მიწოდება, დაცვა ფიზიკური და ქიმიური დეგრადაციისგან და სხვა (Sahni et al.,

2011). ამდენად, ნანო-ფიტომედიცინას გააჩნია პერსპექტიული მომავალი აქტიურობის გაუმჯობესებასა და მცენარეულ მედიკამენტებთან დაკავშირებული პრობლემების გადალახვაში (იხ.სქემა 1.9).



სქემა 1.9. ნანო-ფიტომედიცინის უპირატესობები

ფიტოპრეპარატების უმრავლესობა მიიღება პერორალური გზით, რადგან ამ ფორმით მიღება შედარებით მეტად კომფორტულია პაციენტისთვის და ასევე წარმოების უპირატესობებით ხასიათდება. წამლის პერორალური გზით მიღების დროს, მათი შეწოვის პროცესში არის ორი კრიტიკული საფეხური (RDS), რომელიც ანელებს შეწოვის პროცესს. პირველი ეს არის დაშლის სიჩქარე და მეორე საფეხური კი წამლის ფერმენტაცია მემბრანის გავლით. ჰიდროფობური და წყალში მცირედ ხსნადი წამლის დაშლა არის კრიტიკული საფეხური, ხოლო ასეთი წამლის შეწოვა ლიმიტირებული იქნება დაშლის სიხშირის მიხედვით. თუ პრეპარატი ჰიდროფილურია და ძალიან კარგად იხნება წყალში, მაშინ დაშლის პროცესი იქნება სწრაფი და შეწოვის პროცესში

კრიტიკული საფეხური იქნება მემბრანის გავლა და ფერმენტაცია. ამავდროულად, როცა შეზღუდულია ფერმენტაცია შესაბამისად შეზღუდულია ტრანსმემბრანული გავლა.

ფიტომედიცინის აღნიშნული პრობლემების გადაჭრის გზაა ნანოფიტომედიცინა, რომელიც გულისხმობს მათი ზედაპირის მოდიფიკაციას, ფიტოპრეპარატებთან პოლიმერების მიერთებას, ნანომატარებლებზე დატანას (Yadav et al., 2011).

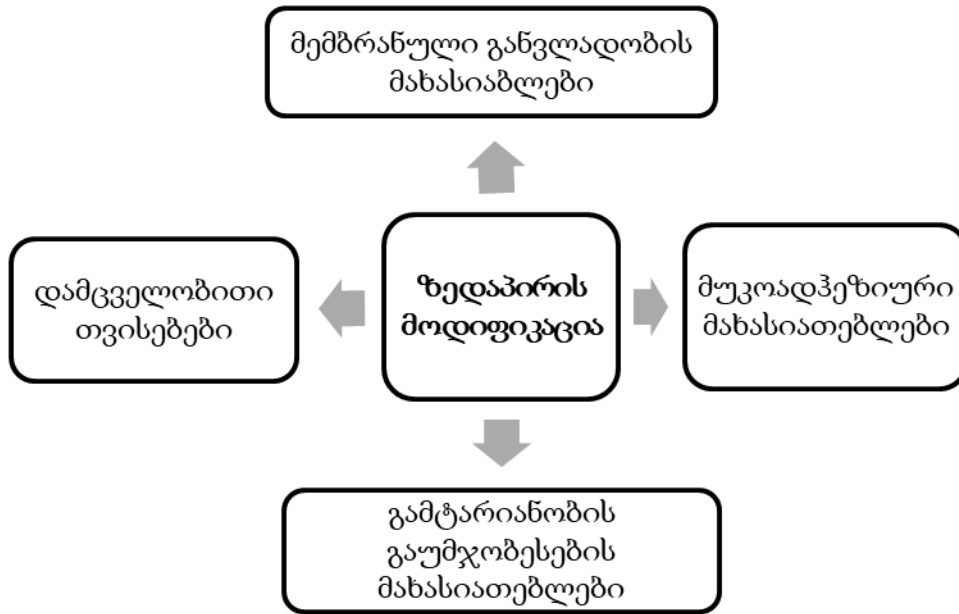
ზედაპირის მოდიფიკაცია შესაძლებელია მიღწეული იქნას ზედაპირის ჰიდროფილური საფარით, სტაბილიზაციით, მუკოადაპტიური პოლიმერებით / ზედაპირულად აქტიური ნივთიერებებით (ზან) ან ბიოდეგადირებად კოპოლიმერებთან ჰიდროფილური სეგმენტების წარმოებით. ეს მოდიფიკაციები ცვლის ნანონაწილაკების ძეგა-პოტენციალს, ჰიდროფობურობას, სტაბილურობას, მუკოადაპტიურ მახასიათებლებს და მათ ზედაპირზე ცილის შეწოვას.

ნაწილაკების ათვისებაზე მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს მათი ზედაპირის მახასიათებლები და ზომა. ზედაპირის მოდიფიკაციით შეიძლება მემბრანული განვლადობის და გამტარიანობის გაზრდა (Kadiyala et al., 2010) (სქემა 1.10).

ერთი-ერთი ყველაზე დიდი დაბრკოლება, პერორალურად მიღებული ფიტოპრეპარატებისთვის არის მათი არასაკმარისი მდგალობა კუჭნაწლავის ტრაქტში. ზედაპირ-მოდიფიცირებული მიკრო ან ნანო ფიტოპრეპარატი შეიძლება გამოყენებულ იქნას, როგორც ეფექტური სტრატეგია ამ პრობლემის გადასაჭრელად.

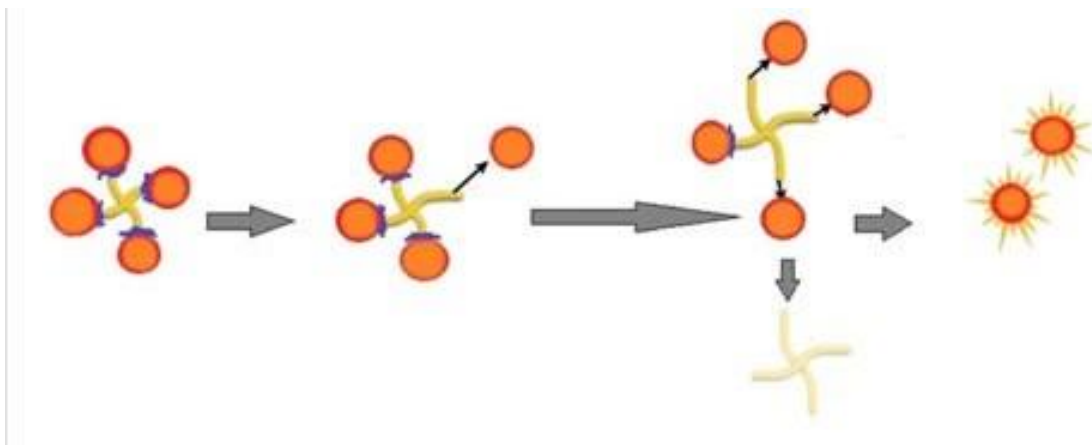
ბიოსამედიცინო სფეროში გამოიყენება სხვადასხვა პოლიმერი, მაგალითად, პოლივინილ ქლორიდი გამოიყენება კარდიალური კათეტერების, ქირურგიული ფირების, ხელოვნური გულის, სისხლის ტუმბოების და ხელოვნური კიდურების წარმოებაში (Muskovich et al., 2012). პოლიმერის ზედაპირის შეცვლით შეიძლება სასურველი თვისებების მიღწევა, როგორცაა სისხლის შედედების პრევენციისთვის წამლის კონტროლირებადი გამოთავისუფლება (Martins et al., 2007).

თითოეული ნაწილაკი არის მატრიცა, სადაც პოლიმერში დისპერსირებულია წამალი და რომლიდანაც პირველ რიგში გამოთავისუფლდება სამკურნალო საშუალება.



სქემა 1.10. ზედაპირის მოდიფიკაციით შეცვლილი მახასიათებლები

მიკროსფეროების შესაქმნელად გამოყენებული პოლიმერები ბიოდერაიდრებადი და არა ბიოდერაიდრებადია. ამ მიკრონაწილაკური გადამტანების წარმოება ხდება ისეთი პოლიმერების საფუძველზე, როგორცაა ალბუმინი, ჟელატინი, მოდიფიცირებული სახამებელი, პოლიპროპილენი, დექსტრანი, პოლილაქტიკური მჟავა და პოლი-ლაქტად-კო-გლიკოლიდი და სხვა. წამლის გამოთავისუფლება კონტროლირდება მატრიცის გახსნით და დაშლადობით. (სურათი 1.7).



სურათი 1.7. წამლის კონტროლირებადი გამოთავისუფლება

ნანონაწილაკების, როგორც მიწოდების სისტემის შექმნის მთავარ მიზანს წარმოადგენს ნაწილაკების ზომის მართვა, ზედაპირის თვისებების და ბიოაქტიური ნივთიერებების გამოთავისუფლების კონტროლი პრეპარატის სპეციფიური მოქმედების მისაღწევად თერაპიულად ოპტიმალური სიჩქარით და დოზირების რეჟიმით. ფიტომედიცინაში, წამლის მიწოდების სისტემაში ნანონაწილაკების გამოყენებას აქვს გარკვეული უპირატესობები:

1) ნანონაწილაკების ზომა და ზედაპირის მახასიათებლები შეიძლება მარტივად შეიცვალოს როგორც პასიური, ისე აქტიური სამიზნის შემთხვევაში.

2) კონტროლირებადი გამონთავისუფლების და დაშლის მართვა მარტივად შეიძლება მატრიცების შემადგენლობით, ასევე პრეპარატის შეტანა სისტემაში შესაძლებელია ქიმიური რეაქციის გარეშე და მაღალი დოზით.

3) ნანონაწილაკების ზედაპირის თვისებები ხელს უწყობს წამლის სპეციფიურ მიწოდებას ადგილზე, ნაწილაკების ზედაპირის სამიზნე ლიგანდებთან მიმაგებას.

1.6 მუკოადჰეზიური პოლიმერები

ბიოსამედიცინო პოლიმერებს შორის განსაკუთრებული ადგილი უკავიათ ბიოდეგადირებად პოლიმერებს, რომლებიც იშლებიან ორგანიზმში და რომელთა მიზანია დროებითი ფუნქციის შესრულება, მაგ.: სამკურნალო პრეპარატების კონტროლირებად/უწყვეტი გამოყოფის სისტემების სახით (Liong et al., 2008).

დღეისათვის მედიკამენტოზური თერაპიის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პრობლემაა წამლების ორგანიზმისთვის სელექციური, მიზანმიმართული, კონტროლირებადი მიწოდების საკითხი.

სამკურნალო პრეპარატების დიფერენცირებული მიწოდების ერთ-ერთი გზაა მატარებლებისა და მატრიქსების გამოყენება. ბევრი მატარებლის როლი მხოლოდ მიწოდებით არ შემოიფარგლება, მათ შეიძლება აგეთვე დაიცვან წამლები და სხვა

ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები (მაგ.: ფერმენტები), შეინახონ ისინი რეზერვუარში და თანდათან გამოათავისუფლონ.

წამლების კონტროლირებად / უწყვეტი გამოყოფის სისტემების კონსტრუირებისათვის მატრიქსის (შემკვრელის) სახით უპირატესობას ანიჭებენ ნაკლებად იმუნოგენურ, სინთეზურ პოლიმერულ სისტემებს, განსაკუთრებით ისეთ სისტემებს, რომლებიც მხოლოდ ზედაპირულ ეროზიას განიცდიან მუდმივი სიჩქარით და რომლის რეგულირება ფართო ზღვრებში იქნება შესაძლებელი, ვინაიდან ეროზიის სიჩქარე განსაზღვრავს (აკონტროლებს) წამლის გამოყოფის სიჩქარესა და კონცენტრაციას მიმდებარე ქსოვილებში. ამავე დროს პოლიმერულ მატრიქსს უნდა ახასიათებდეს საკმაოდ მაღალი ჰიდროფობურობა, რათა გამოირიცხოს სტრუქტურიდან წამლის არაკონტროლირებადი დიფუზია.

წამლის მიწოდების მუკოადჰეზიური პოლიმერული სისტემა შეიქმნა ფარმაკოლოგიურად აქტიური ნაერთების პერორალური ბიომელწევადობის გასაუმჯობესებლად. ეს სისტემები დამყარებულია ბუნებრივ ან სინთეზურ პოლიმერებზე, რომელთაც თავის მხრივ, შეუძლიათ გააძლიერონ მედიკამენტის შეღწევადობა, რეტენცია და შეუნარჩუნონ მათ ლორწოვან გარემოში მოქმედების უნარი.

პერორალური წამლების მიწოდების სისტემების შექმნის მიზანი ახლად შემუშავებული წამლების ფორმულირების განვითარების გარდა, არის უკვე დამკვიდრებული წამლების დოზირებული ფორმების ოპტიმიზაცია. ასეთი ტიპის ოპტიმიზაცია შესაძლოა მოიცავდეს ბიომელწევადობის გაზრდას, გვერდითი ეფექტების შემცირებას ან წამლის მიღების სიხშირის შემცირებას. ბიომელწევადობის გაზრდის შესაძლებლობები არის მაგალითად ჰიდროლიზური დაშლის დათრგუნვა პროტეოლიზური ფერმენტების მიერ, ლუმინალით მეტაბოლიზმის დათრგუნვა, ციტოზოლიური ფერმენტები და ნაწლავის ეპითელიუმის გასწვრივ მემბრანის გამტარობის გაზრდა. Bernkop-Schnürch -მა და სხვებმა აჩვენეს, რომ თიოლირებული პოლიმერები ხასიათდება გაზრდილი მუკოადჰეზიურობით, კონტროლირებადი გამონთავისუფლებით, გაზრდილი შეღწევადობით და ფერმენტების ინჰიბიტორული

თვისებებით. ე.წ. თიომერები წარმოადგენენ მუკოადჰეზიური და გაზრდილი შეღწევადობის პოლიმერების ახალ თაობას.

წამლის ჰიდროფილური მოდელების ნაწლავის ლორწოვანის გასწვრივ შეღწევადობის კვლევებმა აჩვენა აქტიური ნივთიერების მნიშვნელოვნად გაუმჯობესებული აბსორბცია თიომერების თანაობისას თიოლირებული პოლიმერების გლუტათიონთან კომბინაციით. ლორწოვან გარემოში მოქმედების უნარის წყალობით წამლის შეწოვა ლორწოვან ზედაპირზე უფრო სწრაფად ხდება, შესაბამისად იზრდება ბიომეღწევადობა და ნივთიერების სისხლში სწრაფი გადასვლა. მუკოადჰეზიური პოლიმერები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ასეთი სისტემების შექმნაში ახანგრძლივებენ რა აქტიური ნივთიერების მოქმედებას სასურველ ადგილას.

თავისი ბიომეთავსებადობით, ბიოდეგადირებულობით, დაბალი ტოქსიკურობით და შეღწევადობის გაძლიერებული ეფექტების გათვალისწინებით ხიტოზანი (CH) იდეალური პოლიმერი აღმოჩნდა წამლის მიწოდების ასეთ სისტემებში ჩართულობისათვის (Guggi et al., 2003). უფრო მეტიც, პოლიმერის ძირითად ჯაჭვზე შედარებით ადვილია სასურველი ფუნქციური ჯგუფების შექმნა. ხიტოზანიდან წარმოებულ ნაერთებს თავიანთ ზედაპირზე აქვთ თიოლების (-SH) ჯგუფი, რის წყალობითაც ისინი ხასიათდებიან როგორც შესანიშნავი ეფლუქსური ტუმბო-ინჰიბიტორები, გამოირჩევიან უჯრედშეღწევადობით, ლორწოვან გარემოში სიცოცხლის უნარიანობით და ა.შ. (Casettari et al., 2010). ზოგიერთი კვლევა ადასტურებს გლუტათიონის გამოყენებას ხიტოზან-გლუტათიონის (CH -GSH) კონიუგატების სინთეზში. გლუტათიონი (GSH) უსაფრთხო ტოქსიკოლოგიური პროფილის მქონე მცირე ზომის ტრიპტიდია, რომელიც ხელს უწყობს უჯრედულ ადჰეზიას და შესაფერისი ნივთიერებაა ბიოსამედიცინო გამოყენებისათვის. CH-სთან შედარებით CH-ს კომბინაციამ აღდგენილ GSH-სთან გამოავლინა შეღწევადობის გაზრდის ეფექტი.

პოლიაკრილის მჟავა (PAA) სინთეზური, ანიონური, არა ტოქსიკური პოლიმერია, რომელიც ფართოდ გამოიყენება ლორწოვან გარემოში მოქმედი წამლის სისტემების პოლიმერული მიღების სინთეზში. იგი კარგად ნაცადი და კარგი თვისებების მქონე

პოლიმერია. GSH-ს კოვალენტური ბმა PAA-სთან ქმნის ისეთ კონიუგატებს, რომლებიც არამოდიფიცირებულ PAA-სა და სხვა გენერირებულ თიოლირებულ პოლიაკრილის მჟავურ ნაერთებთან შედარებით უკეთეს თვისებებს ავლენენ ლორწოვან გარემოში მოქმედებისას.

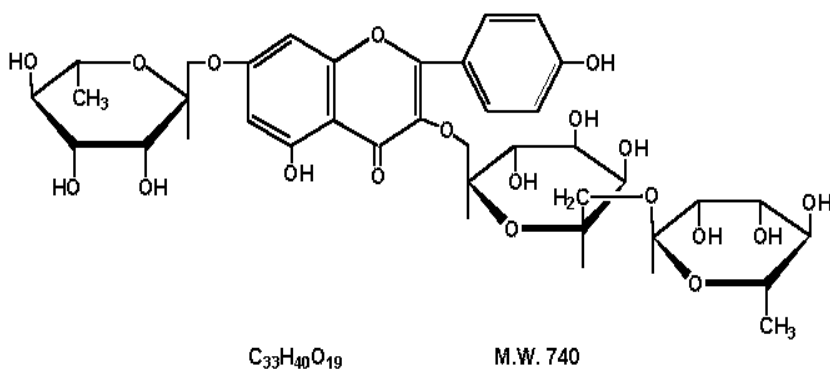
თავი 2

ექსპერიმენტული ნაწილი

2.1 ობიექტები და კვლევის მეთოდები

საკვლევი ობიექტი - კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდი (KRR). CAS N: 301-19-9. ნედლეული: მცენარე Robinia pseudoacacia L. ფოთლები.

კემფეროლ-3-O-D-რობინოზიდი-7-O-β-L-რამნოპირანოზიდის მოლეკულაში მე-7-ე პოზიციაში მიერთებულია რამნოზა, ხოლო მე-3-ე პოზიციაში - რობინოზიდი. რობინოზიდი დიგლიკოზიდია, რომელიც წარმოდგენილია 1 →6 ერთმანეთთან დაკავშირებული გალაქტოზით და რამნოზით.



ფიზიკური მახასიათებლები:

მოლეკულური მასა - 739.209; ლღობის ტემპერატურა - 250 °C; log P (განაწილების კოეფიციენტი ოქტანოლ-წყალში) - 2.640;

ხსნადობა: პრაქტიკულად არ იხსნება წყალსა და ქლოროფორმში. მცირედ ხსნადია 95%-იან ეთანოლში, ხსნადია ცხელ ეთანოლში;

მასალები: ნატრიუმის ქლორიდი (NaCl), კალიუმის ქლორიდი (KCl), ხიტოზანი (საშუალო მოლეკულური მასა: 400 kDa; დეაციტილების ხარისხი: 83-85%) და გლუკოზა შეძენილი Fluka Chemical-იდან; L-გლუტათიონი, მისი ადდგენილი ფორმა

(GSH), 1-ეთილ-3-(3-დიმეთილამინოპროპილ) კარბოდიმიდ ჰიდროქლორიდი (EDAC), N-ჰიდროქსი სუქცინიმიდი (NHS) - Acros-სგან (ბელგია). ხარის ემბრიონის შრატის (FCS) -Gibco-სგან (NR. 26140-079); N - (2- ჰიდროქსიეთილ) პიპერაზინ - N - (2-ეთანესფონურიმჟავა) (HEPES), მინიმალური აუცილებელი გარემო (MEM) და სხვა დანარჩენი რეაგენტები და გამხსნელები მიღებულ იქნა Sigma-სგან. ყველა ქიმიური გამხსნელი და ნივთიერება იყო ანალიზური სისუფთავის. CH-GSH და PAA- GSH სინთეზირებული იყო აღწერილი მეთოდების საფუძველზე (Kafedjiiski et al., 2005; Talaei et al., 2011).

კვლევის ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდები

მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფია - საკვლევი იბიექტის რაოდენობრივი ანალიზისთვის გამოიყენებოდა მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფია, რომელიც ნივთიერებათა ანალიზის, დაყოფის და ფიზიკო-ქიმიური კვლევის თანამედროვე ინსტრუმენტალური მეთოდია და დამყარებულია საკვლევი ნივთიერების მოძრავ და უძრავ ფაზას შორის გადანაწილებაზე. კვლევის - უძრავი ფაზა ძირითადად წარმოდგენილია წვრილმარცვლოვანი სორბენტის (1,8-5მკმ) სახით, ხოლო მოძრავი ფაზა (ელუენტი) სითხეა, რომელიც მოძრაობს სორბენტის ზედაპირზე ან იფილტრება სორბენტის შრეში. ექსპერიმენტი ჩატარდა მაღალი წნევის სითხურ ქრომატოგრაფიებზე - Waters (USA), uv/visible Detector 2489, Binary HPLC Pump1525, რომლის შემადგენლობაშიც შედიოდა: 1525 ბინარული ტუმბო, ნიმუშების ავტომატური მიმწოდებელი; ინჟექტორი 30 მკლ მარყუჭით 2847 ულტრაიისფერი დეტექტორი და მონაცემთა დამუშავების პროგრამა. ქრომატოგრაფიული დაყოფისთვის გამოიყენებოდა ანალიზური სვეტი Platinum EPS C-18 (250x4.6 მმ 5 მკმ ზომის განულებით -Alltech Associates, Inc.). მობილური ფაზა შედგებოდა A და B სითხისგან თანაფარდობით 60/40. A: 5% მეთანოლი ფოსფატურ ბუფერში (pH 2.0; 0.01 M); B: ტეტრაჰიდროფურანი - იზოპროპანოლი-მეთანოლი-წყალი (150:200:67.5:32.5 v/v/v/v); დინების სიჩქარე 1

მლ/წთ. შიდა სტანდარტი - ფისეტინი 20 ნგ/ მლ. განსაზღვრა ხდებოდა 380 ნმ ტალღის სიგძეზე.

ფხვნილისებრი სუბსტანციის გრანულომეტრული ანალიზი

საკვლევი ობიექტის გრანულომეტრული ანალიზი ჩატარდა ორი მეთოდით.

საცრული ანალიზი - ნაწილაკების ზომის განაწილების განსაზღვრა მოხდა სტანდარტული საცრების Retsch VE1000 (Haan, Germany) გამოყენებით ევროპის ფარმაცოპეის 8.0 მეთოდის შესაბამისად (Ph.Eur.). განსაზღვრული რაოდენობის საკვლევი ნივთიერების ფხვნილი თავსდება წინასწარ აწონილი საცრებისგან შემდგარი სვეტის ყველაზე დიდი ზომის (ზედა) საცერში; ანალიზისთვის შერჩეული იქნა შესაბამისი ზომის საცრები. ვიბრაცია გძელდებოდა 10წთ-ის განმავლობაში 2მმ ამპლიტუდით რხევის პირობებში. შემდეგ ისაზღვრებოდა თითოეული ფრაქციის მასა და პროცენტული შემცველობა, რომლის მიხედვითაც ხდებოდა ნაწილაკების ზომის და განაწილების გამოთვლა. წვრილი და მსხვილი ფრაქციები დეტერმინებულ იქნა შესაბამისად როგორც 150 მკმ -ის ქვემოთ და 1400 მკმ-ის ზემოთ ფრაქციებად.

ლაზერული დიფრაქტომეტრული მეთოდი - საკვლევი ნიმუშის გრანულომეტრული ანალიზი ჩატარდა ასევე ლაზერული დიფრაქტომეტრით (LS 100 Q Instrument (Beckman Coulter Particle Characterization) ევროპის ფარმაცოპეის 8.0 მიხედვით. განსაზღვრულ იქნა ისეთი მნიშვნელოვანი პარამეტრები, როგორცაა საშუალო D_{10} , D_{50} , D_{90} და საუტერის საშუალო დიამეტრი: $D(3, 2)$.

ფხვნილის რეოლოგიური პარამეტრების განსაზღვრა

დენადობის მახასიათებლები - სიმკვრივეების განსაზღვრა მოხდა tap tester -ის (tapping machine (J. Englesman, Ludwigshafen, Germany) გამოყენებით. 30 გ საკვლევი სუბსტანციის მოცულობითი სიმკვრივე (V_0) დაფიქსირდა 100 მლ-იან გამზომ ცილინდრში, ხოლო 10 (V_{10}), 500 (V_{500}) და 1250 (V_{1250}) - დატკეპვნის შემდეგ

განისაზღვრა შემჭიდროებითი მოცულობები. თუ V_{500} და V_{1250} - შორის სხვაობა 2%-ზე მეტი იყო, მაშინ ფხვნილი ექვემდებარებოდა კიდევ 1250 დატკეპვნას (V_{2500}). Carr ინდექსი და ჰასნერის კოეფიციენტი გამოთვლილ იქნა ფორმულებით (1, 2).

$$\text{Carr ინდექსი} = 100 \times \frac{V_0 - V_{1250}}{V_0} \quad (1)$$

$$\text{ჰასნერის კოეფიციენტი} = \frac{V_0}{V_{1250}} \quad (2)$$

ფხვნილისებრი სუბსტანციების დენადობის შეფასების აღიარებული შკალა მოცემულია ცხრილი 2.1-ში.

ცხრილი 2.1.

დენადობის შკალა (ევროპის ფარმაკოპეა, 2011)

შემჭიდროების ინდექსი %	დენადობის დახასიათება	ჰასნერის ინდექსი
1-10	ძალიან კარგი	1.00-1.11
11-15	კარგი	1.12-1.18
16-20	საკმარისი	1.19-1.25
21-25	პასიური	1.26-1.34
26-31	ცუდი	1.35-1.45
32-37	ძალიან ცუდი	1.46-1.59
>38	ძალიან სუსტი	>1.60

დენადობის უნარის დასახასიათებლად გამოყენებულ იქნა აპარატი Powder Flow Tester (FT 300), რომელიც საშუალებას იძლევა განისაზღვროს ფხვნილის დენადობა ვიბრაციის და შერევის სხვადასხვა პირობებში. ანალიზი ჩატარდა ევროპის ფარმაკოპეის მეთოდის შესაბამისად.

***In vitro* ბიომელწევადობის შესწავლა**

Caco-2 უჯრედული კულტურის გაზრდა: ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო უჯრედები გადათესვის რიცხვით - 87 (BristolMyers Squibb, Princeton, NJ, USA). უჯრედების კულტივირება ხდებოდა სტანდარტული პროტოკოლის მიხედვით (Sattler S. et al.) 12 ფოსოიან პოლიკარბონატის მემბრანებში (Transwell®, Costar), რომელთა ფორის ზომა 0.4 მკმ-ია და ფოსოს დიამეტრი 12 მმ; საკვებ არედ გამოყენებული იყო მინიმალური აუცილებელი საკვები არე (MEM), რომელიც შეიცავდა 20% ხარის ემბრიონის სტერილურ შრატს (FCS), 1% სტერილური პენიცილინისა და სტრეპტომიცინის ნარევეს და 1.5% გლუტამინს. უჯრედები იზრდებოდა 37⁰-C ტემპერატურაზე, 95% ჟანგბადის და 5%-იანი CO₂ ის პირობებში. საკვები არის გამოცვლა ხდებოდა ყოველ დღე, კერძოდ 1 მლ და 1.5 მლ ოდენობით აპიკალურ და ბაზოლატერალურ კამერაში შესაბამისად.

ტრანსეპითელიარული ელექტრული რეზისტენტობა (TEER) - უჯრედების მთლიანობა დგინდებოდა ტრანსეპითელიარული ელექტრული რეზისტენტობის (TEER) მნიშვნელობის განსაზღვრით ხელსაწყო EVOM® -ის (World Precision Instruments Inc.) საშუალებით, რომელიც დაკავშირებული იყო წყვილ ელექტროდთან. TEER განსაზღვრა ხდებოდა ტრანსპორტირების შესწავლის პროცესში რათა დადგენილი ყოფილიყო მონოშრიანი Caco-2 უჯრედების მთლიანობა.

მონაცემების სტატისტიკური ანალიზი: მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავება და ანალიზი ჩატარდა სტიუდენტის ტესტის მიხედვით. მნიშვნელობის მინიმალური დონე $p < 0.005$. ყველა მონაცემი მინიმუმ 3 ექსპერიმენტის საშუალო მაჩვენებელია.

2.2 ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის ტექნოლოგიური პარამეტრების შესწავლა

აქტიური ფარმაცევტული ინგედიენტების (აფი) მახასიათებლები განსაზღვრავს მიღების ტექნოლოგიური მეთოდის შერჩევას. აფი-ს ტექნოლოგიური პარამეტრების ცოდნა აუცილებელია წამლის ოპტიმალური ფორმის შერჩევისა და შემუშავებისათვის.

ჩვენი კვლევის მიზანი იყო ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის - კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7-რამნოზიდის (KRR) ტექნოლოგიური თვისებების შესწავლა.

KRR მოყვითალო-მწვანე შეფერილობის, წყალში უხსნადი კრისტალური ფხვნილია. ვინაიდან აქტიური სუბსტანციის რეოლოგიურმა მახასიათებლებმა შეიძლება მნიშვნელოვანი ეფექტი იქონიოს წამლის საბოლოო ფორმაზე (მაგ.: ხსნადობა, ბიომელწვეადობა, ერთგვაროვნობა, სტაბილურობა და ა.შ.) ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა KRR-ის ნაწილაკების ზომა და განაწილება, მოცულობითი და შემჭიდროებითი სიმკვრივეები, თავისუფალად დაყრილი ფხვნილის მიერ შექმნილი კუთხე და დენადობის უნარი. ტარდებოდა მინიმუმ სამი ექსპერიმენტი.

ნაწილაკების ზომის განაწილება (PSD) არის სხვადასხვა ზომის ფრაქციების შედარებით პროპორციების შეფასება. მრავალი კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ ფარმაცევტულ ფხვნილების ძირითადი ფრაქცია მოიცავს 150 მკმ და 1400 მკმ შორის დიაპაზონს და მნიშვნელოვანია ხარჯების ეფექტურობის თვალსაზრისით; იგი ასევე გავლენას ახდენს ფხვნილის ფიზიკურ მახასიათებლებზე, რაც თავის მხრივ, მოქმედებს ისეთ თვისებებზე, როგორცაა პროდუქტის ერთგვაროვნება, მოცულობა და ა.შ.

ნაწილაკების ზომა განისაზღვრა სტანდარტული საცრებისა და ლაზერული დიფრაქტომეტრის მეთოდებით.

ნაწილაკების საშუალო დიამეტრი და ზომა შეფასდა საცრული ანალიზის მეთოდით. შერჩეულ იქნა 7 ზომის საცერი განსხვავებული ნასვრეტების დიამეტრით (1000, 500, 425, 300, 250, 140 და 90 მკმ); გაცრა ვიბრო-მოწყობილობის საშუალებით მიმდინარეობდა 10 წუთის განმავლობაში (Engelsmann AKT - GES Apparatebau). საკვლევი ფხვნილის საწყისი მასა იყო 50 გ. სუბსტანციის ნარჩენი წონა საცრებზე გამოყენებული იქნა ნაწილაკების განაწილების სიხშირის შესადგენად.

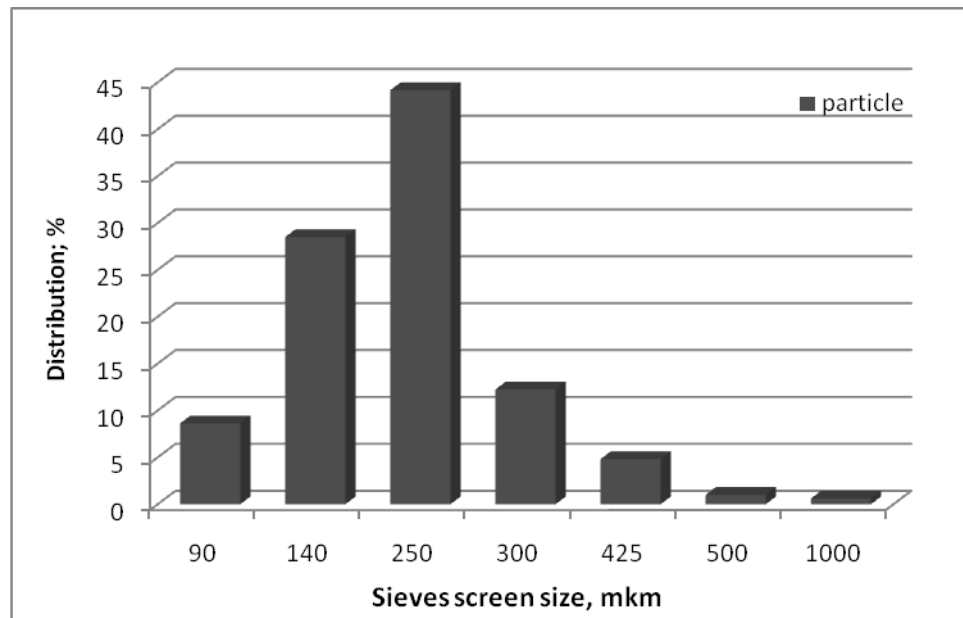
ნაწილაკების საშუალო გეომეტრიული ზომისა ($d_g = 161.51$) და გეომეტრიული სტანდარტული გადახრის (σ_g) მაჩვენებელთა გამოთვლა მოხდა ლოგარითმული დიაგამიდან (ნაწილაკების ზომის), რომელიც აგებული იყო ალბათობის შკალაზე ნარჩენის კუმულაციური პროცენტულობის მიმართ.

ცხრილი 2.2.

KRR-ის განულომეტრული ანალიზი საცრული მათოდით

საცრების ნასვრეტების ხომის ინტერვალი	საცრების ცენტრებს შორის მანძილი, მკმ	Log d	საცრები ს მასა, გ	საცრის მასა + ფხვნილის მასა,გ	საცერზე დარჩენილი ფხვნილის მასა, გ	საცერზე დარჩენილი ფხვნილის მასა (F), %	კუმულა ციური, %	F*logd	F*(log d-log dg) ²
0-90	31.5	1.50	430.5	434.8	4.3	8.63	8.63	12.93	1.22
90-140	67.0	1.83	388.5	402.7	14.2	28.51	37.14	52.06	0.06
140-250	75.5	1.88	392.8	414.72	21.9	44.01	81.15	82.64	0.00
250-300	102.5	2.01	413.9	420.07	6.2	12.39	93.54	24.91	0.23
300-425	162.5	2.21	409	411.42	2.4	4.86	98.39	10.74	0.55
425-500	225.0	2.35	444.1	444.6	0.5	1.00	90.76	2.36	0.23
500-1000	750.0	2.88	442	442.3	0.3	0.60	62.86	1.73	4.98
ჯამი					49.8	100.00		187.38	7.28

მიღებული მონაცემების მიხედვით (ცხრილი 2.2; სურათი 2.1) საკვლევი ნიმუში ძირითადად წარმოდგენილი იყო ნაწილაკებისგან, რომელთა ზომა მერყეობდა 140 – 250 მკმ ფარგლებში (72.69%); ნაწილაკთა ზომის განაწილების ვიწრო დიაპაზონი ($\sigma = 1.70$) ფხვნილის ჰომოგენურობის მანიშნებელია.

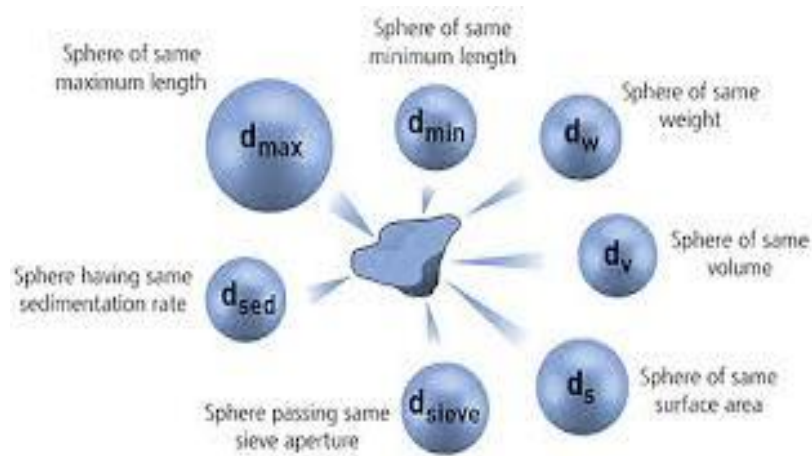


სურათი 2.1. KRR-ში ნაწილაკების ზომის განაწილება სტანდარტული საცრების გამოყენებით. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

უკანასკნელი რამდენიმე წლის განმავლობაში, წვრილად დისპერსირებული ნაწილაკების ზომის განაწილების გამოზომი აპარატურის პროგნოზირება განაპირობა ლაზერული ტექნოლოგიების და კომპიუტერული პროგრამული უზრუნველყოფის განვითარებამ. ნაწილაკების გამოზომი მრავალი სახის ხელსაწყო დაფუძნებულია ფიზიკურ პრინციპებზე, როგორცაა ვიზუალური დაკვირვება, სტოქსის სედიმენტაციის კანონი, ლაზერული დიფრაქცია, გაზნევის თეორია და ნაწილაკების ელექტრული დათვლა.

ლაზერული დიფრაქცია ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული მეთოდია ნაწილაკების ზომის ანალიზისთვის. ის ეფუძნება კვლევებს, რომლის მიხედვითაც

ნაწილაკების მიერ დაშლილი სინათლის (ლაზერის) კუთხე შეესაბამება მის ზომას. კომპლექსურ ნიმუშებში, რომელებიც შეიცავენ სხვადასხვა ზომის ნაწილაკებს, სინათლის გარდატეხის შედეგები იძლევა სპეციფიურ დიფრაქციულ სურათს. ასეთი შემთხვევის გაანალიზებისას, შესაძლოა დადგინდეს ნიმუშის ზუსტი ზომების (ანუ ნაწილაკების ზომის განაწილება) შემადგენლობა (სქემა 2.1).



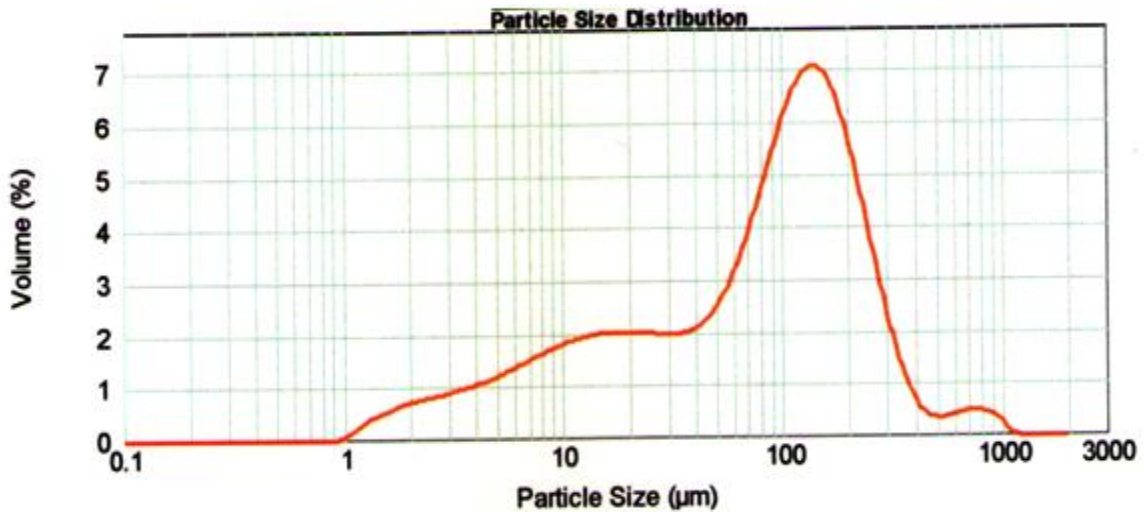
სქემა 2.1. ეკვივალენტური სფეროების კონცეფციის ილუსტრაცია

KRR-ის საშუალო მოცულობითი დიამეტრისა D_{50} და საუტერის საშუალო დიამეტრის $D(3,2)$ (მკმ) გამოთვლა, ასევე ნაწილაკების ზომის და განაწილების განსაზღვრა ჩატარდა ასევე ლაზერული დიფრაქტომეტრით (LS 100 Q Instrument (Beckman Coulter Particle Characterization)). მიღებული შედეგები მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია.

დადგენილ იქნა საკვლევი ფხვნილისთვის ძირითადი პარამეტრები, კერძოდ $D_{10} = 6.76$ მკმ, $D_{50} = 90.51$ მკმ, $D_{90} = 240.7$ მკმ და საუტერის საშუალო დიამეტრი: $D(3, 2) = 18.19$.

როგორც სურათი 2.2 - დან ჩანს, KRR ხასიათდება ნაწილაკების ზომის მულტიმოდალური განაწილებით; ყველაზე მაღალი პიკი დაახლოებით 100-250 მკმ (მოდალური დიამეტრი - 116.03 მკმ) ხოლო დაბალი პიკი დაახლოებით 700 – 800 მკმ ზომის ნაწილაკების დიაპაზონებშია მოთავსებული; დაბალი პიკის არსებობა სავარაუდოდ განპირობებულია სისტემაში აგლომერირებული ნაწილაკების

არსებობით; აღნიშნული პიკის ვიწრო სიგანე და დაბალი სიმაღლე ადასტურებს საკვლევის ნივთიერების ჰომოგენურობას.



სურათი 2.2. KRR-ში ნაწილაკთა ზომის განაწილება ლაზერული დიფრაქტომეტრით.

სხვაობა საცრული ანალიზითა და ლაზერული დიფრაქტომეტრით მიღებულ მაჩვენებლებს შორის განპირობებულია თითოეული მეთოდით მიღებული განსხვავებული საზომი ერთეულებით.

დენადობის მახასიათებლები - ფხვნილის დენადობის უნარი იმის მაჩვენებელია თუ რამდენად კარგად შეუძლია ფხვნილს სითხის მაგვარი დინება; დენადობაზე გავლენას ახდენს ნაწილაკების ისეთი პარამეტრები როგორცაა ზომა, ფორმა და ზომის ცვალებადობა.

დენადობის უნარი მნიშვნელოვანი ფაქტორია მთელ რიგ ისეთ მანიპულაციებში, როგორცაა განულაცია, ტაბლეტირება და ა.შ. ამ უკანასკნელის შემთხვევაში მატრიცის მუდმივი და ერთგვაროვანი შევსება განაპირობებს ტაბლეტის ზუსტი მასის და სიმტკიცის უზრუნველყოფას. დაწნევის კოეფიციენტი ანუ Carr კოეფიციენტი და მასთან დაკავშირებული ჰასნერის ინდექსი (Hausner Ratio) არის ფხვნილის დენადობის მახასიათებლების პროგნოზირების მარტივი და სწრაფი მეთოდი, ორივე მაჩვენებელი განისაზღვრება ნაყარი და შემჭიდროებული ფხვნილის მოცულობების გაზომვით.

ფხვნილისებური სუბსტანციის სიმკვრივის ცოდნა მნიშვნელოვანია იმ მოცულობის დასადგენად, რომელსაც ის დაიკავებს გარკვეული წონის შემთხვევაში. უფრო მეტიც, ფხვნილები რომლებიც მნიშვნელოვნად განსხვავდებიან სიმკვრივით მიდრეკილნი არიან დაყოფისაკენ, რაც განაპირობებს არაჰომოგენური ნარევის წარმოქმნას .



სურათი 2.3. სიმკვრივეების განსაზღვრელი tap tester

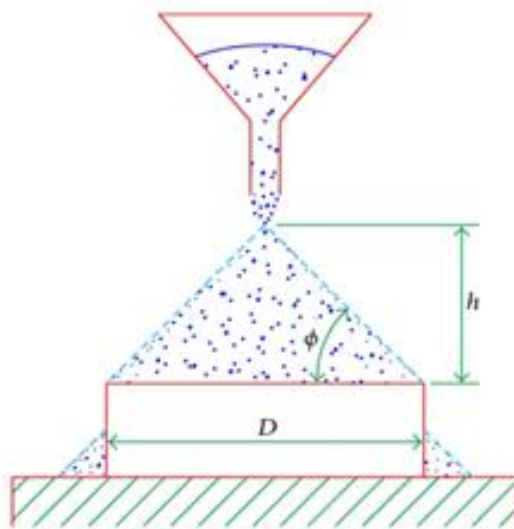
შემჭიდროებითი სიმკვრივის განსაზღვრავად გამოყენებული იქნა powder tester (სურათი 2.3). ექსპერიმენტი ჩატარდა მინიმუმ სამჯერ Ph. Eur.-ში აღწერილი მეთოდის შესაბამისად. თითოეული განსაზღვრისას საზომი ცილინდრი ივსებოდა წინასწარ აწონილი ნიმუშით და ინიშნებოდა ის საწყისი მოცულობა (V_{max}) რომელსაც ფხვნილი იკავებდა. მიღებული მონაცემების საფუძველზე ითვლებოდა მოცულობითი სიმკვრივე (ρ_{min}). შემჭიდროებითი სიმკვრივე (ρ_{max}) განისაზღვრა საზომი ხელსაწყოს ვერტიკალური მოძრაობით ზედაპირზე მანამდე სანამ არ დაფიქსირდა ცილინდრში ფხვნილის მოცულობის მუდმივი მაჩვენებელი (V_{min}). აღნიშნული ანალიზით გამოთვლილ იქნა საყოველთაოდ გამოყენებული ორი მაჩვენებელი.

ჰასნერის ინდექსი (ρ_{max}/ρ_{min}) მიხედვით ხდება ფხვნილის დენადობის უნარის დადგენა. თუ მისი მნიშვნელობა 1.25-ზე მეტია ეს მიუთითებს ფხვნილის დაბალ

დენადობის უნარზე, ხოლო უფრო ნაკლები მაჩვენებლები ასოცირდებიან ზომიერ და საუკეთესო დენადობასთან (ცხრილი 2.1).

შემჭიდროებითი კოეფიციენტის ანუ Carr index ($[(\rho_{\max} - \rho_{\min}) / \rho_{\max}]100\%$) გამონაგარიშება დენადობის განსაზღვრის კიდევ ერთი პოპულარული მეთოდია. კოეფიციენტის 20%-ზე მაღალი მაჩვენებელი დაბალ დენადობაზე, ხოლო 15%-ზე დაბალი - საუკეთესო დენადობაზე მიუთითებს. თუმცა, მარტო ეს მაჩვენებლები ადეკვატურად ვერ აფასებენ ფხვნილის დენადობის უნარს.

თავისუფლად დაყრილი ფხვნილის მიერ შექმნილი კუთხის (AOR) გაზომვით ხდება ფხვნილის კოჰეზიურობის დადგენა და წარმოადგენს დენადობის განსაზღვრის მარტივ მეთოდს. ყველაზე კარგი დინების ფხვნილებისთვის AOR შეადგენს 50° -ზე ნაკლებს.



სქემა 2.2. AOR -ის განსაზღვრის პრინციპი

საკვლევი ობიექტის AOR გაზომვა მოხდა სვაროვსკის მეთოდის მიხედვით (სქემა 2.2). გაზომვის პროცესში ფხვნილი ძაბრიდან იყრება თავისუფლად თევშზე (5.4 სმ.-ის დიამეტრი) კონუსის წარმოქმნამდე და მანამდე სანამ ფხვნილის დამატება აღარ იწვევდა კონუსის სიმდლის მომატებას. AOR-ის (α) გამოთვლა ხდება თევშის რადიუსისა (r) და კონუსის სიმაღლის (H) შეფარდებით: $\text{tg}\alpha = H/r$.

თუმცა მარტო ეს მაჩვენებლები ფხვნილის დენადობის შეფასებას ზუსტად ვერ ახდენენ. KRR-ის დენადობის უნარის დასახასიათებლად დენადობის საშუალო მაჩვენებლის (α'/α_{ref}) განსაზღვრა მოხდა FLOWTESTER ზე (სურათი 2.4), რომელიც შედგება რკინის ძაბრისა და კომპიუტერთან მიერთებული სასწორისგან, რომელიც მუდმივად აფიქსირებს ფხვნილის წონას. ძაბრზე მიერთებული ვიბრატორი არეგულირებდა ფხვნილის დენადობას. საშუალო დენადობის მაჩვენებელი შეფასდა წრფივი რეგესიით (სურათი 2.5).



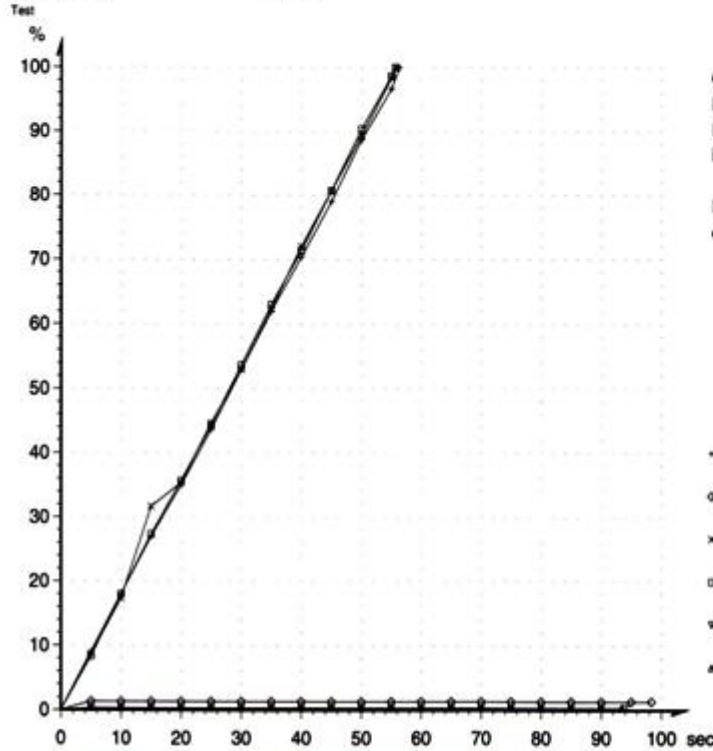
სურათი 2.4. FLOWER TESTER

მოცემული მნიშვნელობები წარმოადგენს სულ მცირე ხუთი ჩამოყრის საშუალო მაჩვენებელს.

საკვლევი ობიექტის ტექნოლოგიური პარამეტრების მონაცემები წარმოდგენილია ცხრილი 2.3-ში.

Flowability analysis

Method: TEST.RPX
 Test No: #1 #2 #3 #4 #5 #6
 Previbrate: 0 0 0 0 3 3
 Vibrate: 0 1 2 3 0 3
 Reference [g]: 100%= 300.0 g
 Previb. time: 10 sec



Constants:
 Mixing: 2 times
 Previbrate: 10 sec
 Number of tests: 6 #

Reference Flow angle:
 $\alpha_{ref} = 82^\circ$

#6
 #5
 #4
 #3
 #2
 #1

#1 —▲			#2 —▽			#3 —□			#4 —×			#5 —◇			#6 —→		
sec	h	α°	sec	h	α°	sec	h	α°	sec	h	α°	sec	h	α°	sec	h	α°
93.4	0.5	0.0	94.1	0.6	0.0							99.6	1.4	0.0			
90.1	0.5	0.0	90.1	0.6	0.0							95.0	1.4	0.0			
85.1	0.5	0.0	85.1	0.6	0.0							90.1	1.4	0.0			
80.1	0.5	0.0	80.1	0.6	0.0							85.1	1.4	0.0			
75.0	0.5	0.0	75.0	0.6	0.0							80.1	1.4	0.0			
70.0	0.5	0.0	70.0	0.6	0.0							75.1	1.4	0.0			
65.0	0.5	0.0	65.0	0.6	0.0							70.0	1.4	0.0			
60.1	0.5	0.0	60.1	0.6	0.0	55.8	100.0	59.0	55.7	100.3	62.8	60.0	1.4	0.0			
55.1	0.5	0.0	55.1	0.6	0.0	55.1	98.9	59.2	55.0	98.5	61.7	55.1	1.4	0.0	56.6	100.2	65.6
50.1	0.5	0.0	50.1	0.6	0.0	50.1	90.5	62.5	50.1	89.4	59.8	50.1	1.4	0.0	55.1	96.9	58.3
45.1	0.5	0.0	45.1	0.6	0.0	45.1	80.9	61.5	45.1	80.8	59.8	45.1	1.4	0.0	50.1	88.8	62.5
40.0	0.5	0.0	40.0	0.6	0.0	40.0	71.5	59.5	40.1	72.2	62.7	40.1	1.4	0.0	45.1	79.2	60.4
35.0	0.5	0.0	35.0	0.6	0.0	35.0	63.0	61.2	35.1	62.5	61.0	35.0	1.4	0.0	40.1	70.4	58.7
30.0	0.5	0.0	30.1	0.6	0.0	30.0	53.9	62.7	30.0	53.3	59.2	30.0	1.4	0.0	35.0	62.0	60.1
25.1	0.5	0.0	25.1	0.6	0.0	25.1	44.4	60.1	25.0	44.9	61.7	25.0	1.4	0.0	30.0	53.3	62.0
20.1	0.5	0.0	20.1	0.6	0.0	20.1	35.7	58.9	20.0	35.6	58.5	20.1	1.4	0.0	25.0	43.9	60.3
15.1	0.5	0.0	15.1	0.6	0.0	15.1	27.4	62.0	15.1	31.7	70.5	15.1	1.4	0.0	20.1	35.3	58.6
10.1	0.5	1.1	10.0	0.6	2.3	10.1	18.0	61.5	10.1	17.6	60.7	10.1	1.4	0.0	15.1	27.1	60.4
5.0	0.4	4.6	5.0	0.4	4.6	5.0	8.6	59.8	5.1	8.7	59.6	5.1	1.4	15.4	10.1	18.3	61.2
$\alpha_1 = 0.3^\circ$			$\alpha_2 = 0.4^\circ$			$\alpha_3 = 60.7^\circ$			$\alpha_4 = 59.8^\circ$			$\alpha_5 = 0.8^\circ$			$\alpha_6 = 60.8^\circ$		

Results: α'/α_{ref} Flow quality
 0.9 - 1.0 very good
 0.8 - 0.9 good
 0.7 - 0.8 satisfactory
 0.6 - 0.7 medium
 0.5 - 0.6 unsatisfactory
 0.4 - 0.5 poor
 0.3 - 0.4 very poor

$$\alpha' = \frac{\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 + \alpha_4 + \alpha_5 + \alpha_6}{6} = 30.5^\circ$$

$$\alpha'/\alpha_{ref} = 0.37$$

სურათი 2.5. FLOW TESTER-თ განსაზღვრული KRR-ს დენადობის ანალიზი.

დენადობის უნარი ფასდება დაწნევის ინდექსისა (Ic) და ჰასნერის კოეფიციენტებით (HR) როგორც ზემოთ იქნა აღნიშნული. თუ ფხვნილი ადვილად იწნება, მაშინ მას მეტი ენერგია სჭირდება დენადობისთვის. მიღებული შედეგების საფუძველზე KRR-ის დენადობა შეფასდა როგორც „ძალიან დაბალი“ გამომდინარე მისი დაწნევის ინდექსისა (Ic = 27.31%) და ჰასნერის (HR =1.38) კოეფიციენტის მნიშვნელობებიდან .

ცხრილი 2.3.

KRR-ის რეოლოგიური კვლევის შედეგები

ნივთიერება	მოცულობითი სიმკვრივე (გ/სმ ³)	შემჭიდროვებითი სიმკვრივე (გ/სმ ³)	Ic (%) (≤20%)	HR (≤1.2)	AOR° (≤45-50°)	α'/α _{ref}
	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD
KRR	0.50 ± 0.05	0.69 ± 0.07	27.31 ± 1.09	1.38 ± 0.02	58.15 ± 1.14	0.37

AOR: თავისუფლად დაყრილი ფხვნილის მიერ შექმნილი კუთხე (გადუსებში); Ic: დაწნევის ინდექსი (%-ში); HR: ჰასნერის კოეფიციენტი; α'/α_{ref}: დენადობის ინდექსი (Flow tester-ით).

დენადობის გაზომვის მეთოდების გამოყენება, ცნობილი როგორც დინამიური პროცედურები, წარმოადგენს ფხვნილის ექსპერიმენტულ მონაცემთა და რეალურ ტექნოლოგიურ მახასიათებლებს შორის მჭიდრო ურთიერთკავშირს.

ამგვარად, თავისუფლად დაყრილი ფხვნილის მიერ შექმნილი კუთხის გაზომვის მეთოდი დინების დინამიური განსაზღვრის საშუალებას იძლევა იმ წინააღმდეგობების ანალიზით რომლებიც ნაწილაკებს ხვდება თავისუფალი დინებისთვის ნასვრეტიდან ბრტყელ ზედაპირზე. თავისუფლად დაყრილი ფხვნილის კუთხის გაზომვა ფარმაცევტული ფხვნილის დენადობის ტრადიციული განსაზღვრის მეთოდია და მაჩვენებელი <30° მიანიშნებს „საუკეთესო“ დენადობაზე, ხოლო > 56° - „ძალიან დაბალ“ დენადობაზე. ამ პარამეტრის და დენადობის კოეფიციენტის (α'/α_{ref} = 0.37)

მიხედვითაც საკვლევი ფხვნილის დენადობა შეფასდა როგორც „ძალიან დაბალი“ ($AOR = 58.15^\circ$) ცხრილი 2.3.

მიღებული მონაცემები საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ KRR გამოირჩევა დენადობისა და დაწნეხვის დაბალი მაჩვენებლებით და სამკურნალო ფორმის შემუშავებისას მოითხოვს კრიტიკულ მიდგომას დამხმარე ნივთიერებების შესარჩევად.

შედეგები:

1. შესწავლილ იქნა ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის KRR-ის ტექნოლოგიურ - რეოლოგიური თვისებები;

2. საკვლევ ობიექტში გრანულომეტრული ანალიზი ჩატარდა სტანდარტული საცრებისა და ლაზერული დიფრაქტომეტრის მეთოდებით.

3. საცრული ანალიზით მიღებული შედეგების თანახმად საკვლევი ნიმუში ძირითადად - 72.69% - წარმოდგენილი იყო 140 – 250 მკმ ზომის ნაწილაკებისგან, და ახასიათებდა განაწილების ვიწრო დიაპაზონი - $\sigma_g = 1.70$, რაც ფხვნილის ჰომოგენურობის მანიშნებელია.

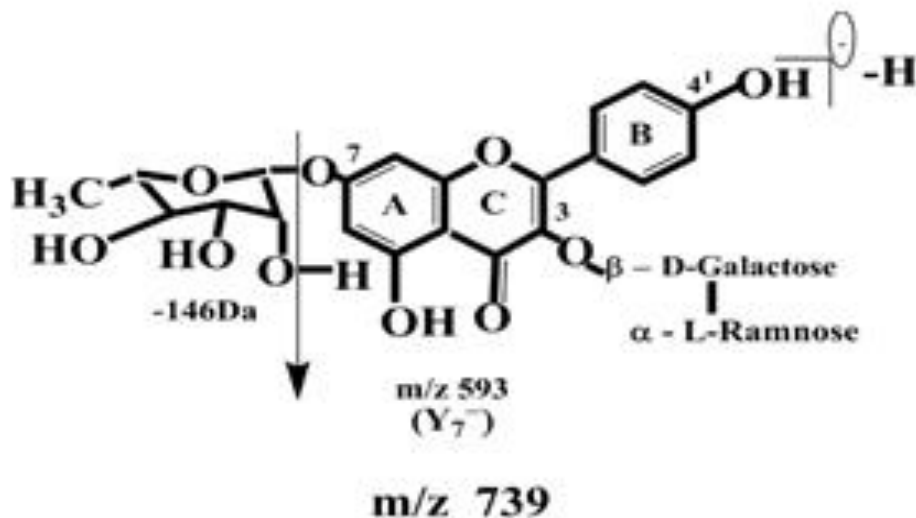
4. ლაზერული დიფრაქტომეტრის ანალიზით დადგენილ იქნა, რომ KRR ხასიათდება ნაწილაკების ზომის მულტიმოდალური განაწილებით: ყველაზე მაღალი პიკით - 100-250 მკმ (მოდალური დიამეტრი - 116.03 მკმ) და დაბალი პიკით 700 – 800 მკმ ზომის ნაწილაკების დიაპაზონებში; ამ უკანასკნელის ვიწრო სიგანე და დაბალი სიმადლე ადასტურებს საკვლევი ნივთიერების ჰომოგენურობას. ასევე განისაზღვრა ძირითადი განულომეტრული პარამეტრები, კერძოდ $D_{10} = 6.76$ მკმ, $D_{50} = 90.51$ მკმ, $D_{90} = 240.7$ მკმ და საუტერის საშუალო დიამეტრი: $D(3, 2) = 18.19$.

5. რეოლოგიური კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ ბიოფლავონოიდისათვის დამახასიათებელია დენადობისა და დაწნეხვის დაბალი მაჩვენებლები, კერძოდ $AOR = 58.15^\circ$; $I_c = 27.31\%$, $HR = 1.38$, და დაბალი დენადობის ინდექსი - $\alpha'/\alpha_{ref} = 0.37$. მიღებული შედეგები მიუთითებს, იმაზე რომ რომ საკვლევი

ფხვნილისთვის დამახასიათებელია ცუდი დენადობა და დაბალი დაწნევის უნარი, რაც სათანადო მიდგომას მოითხოვს წამლის შესაბამისი ფორმის შექმნის პროცესში.

2.3 KRR-ის რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდის შემუშავება ბიოლოგიურ სითხეებში

მიუხედავად იმისა, რომ ჩატარებულია შედარებით დიდი რაოდენობით კვლევები ზოგიერთი ფლავონოიდების ბიოშელწევადობის და აბსორბციის შესახებ, KRR -ის შესახებ ცნობილია, მხოლოდ ის ფაქტი, რომ პერორალურად მიღებისას ნაწლავის მიკროფლორის მიერ ხდება მისი ჰიდროლიზი კემფეროლად (სქემა 2.3) (Duggan et al., 2016; Kafedjiiski et al., 2005; Talaei et al., 2011). იმისათვის, რომ შეფასდეს ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის ბიოშელწევადობა საჭიროა მისი რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდის შემუშავება ბიოლოგიურ სითხეებში. ამ მიზნისთვის მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენება (HPLC) ყველაზე მიზანშეწონილია (სურათი 2.6).



სქემა 2.3. KRR-ის ფრაგმენტაციის მოწოდებული სქემა



სურათი 2.6. მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფიული სისტემა

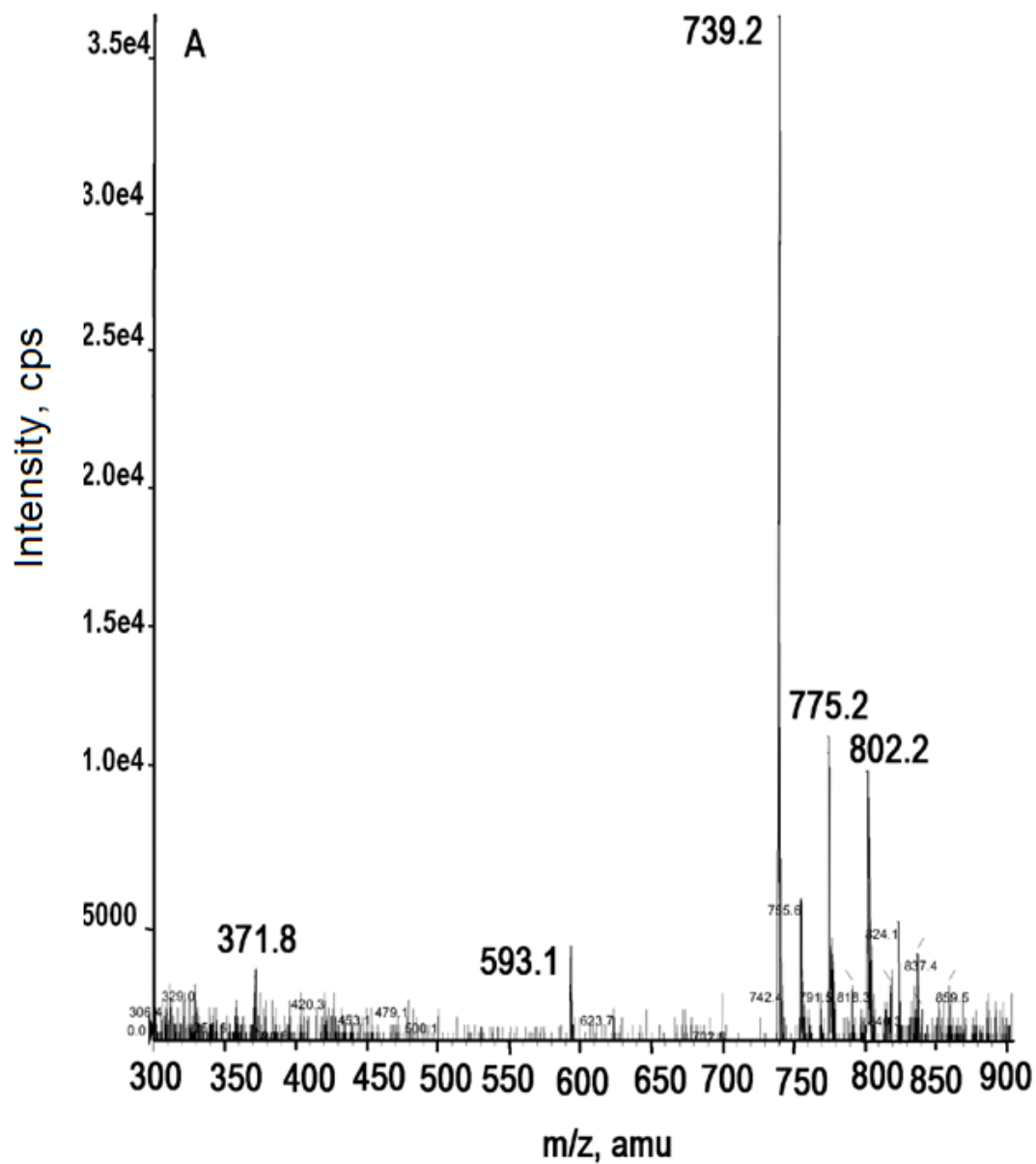
მეთოდის შემუშავებისას KRR-ის შიდა სტანდარტი შერჩეულ იქნა საკვლევი ნივთიერების მახასიათებლების გათვალისწინებით.

მას სპექტრალური პარამეტრების ოპტიმიზაციის მიზნით მომზადებულ იქნა KRR და ფისეტინის სტანდარტული ხსნარები (1 მკგ/მლ) მეთანოლის წყალიან ხსნარში (50:50).

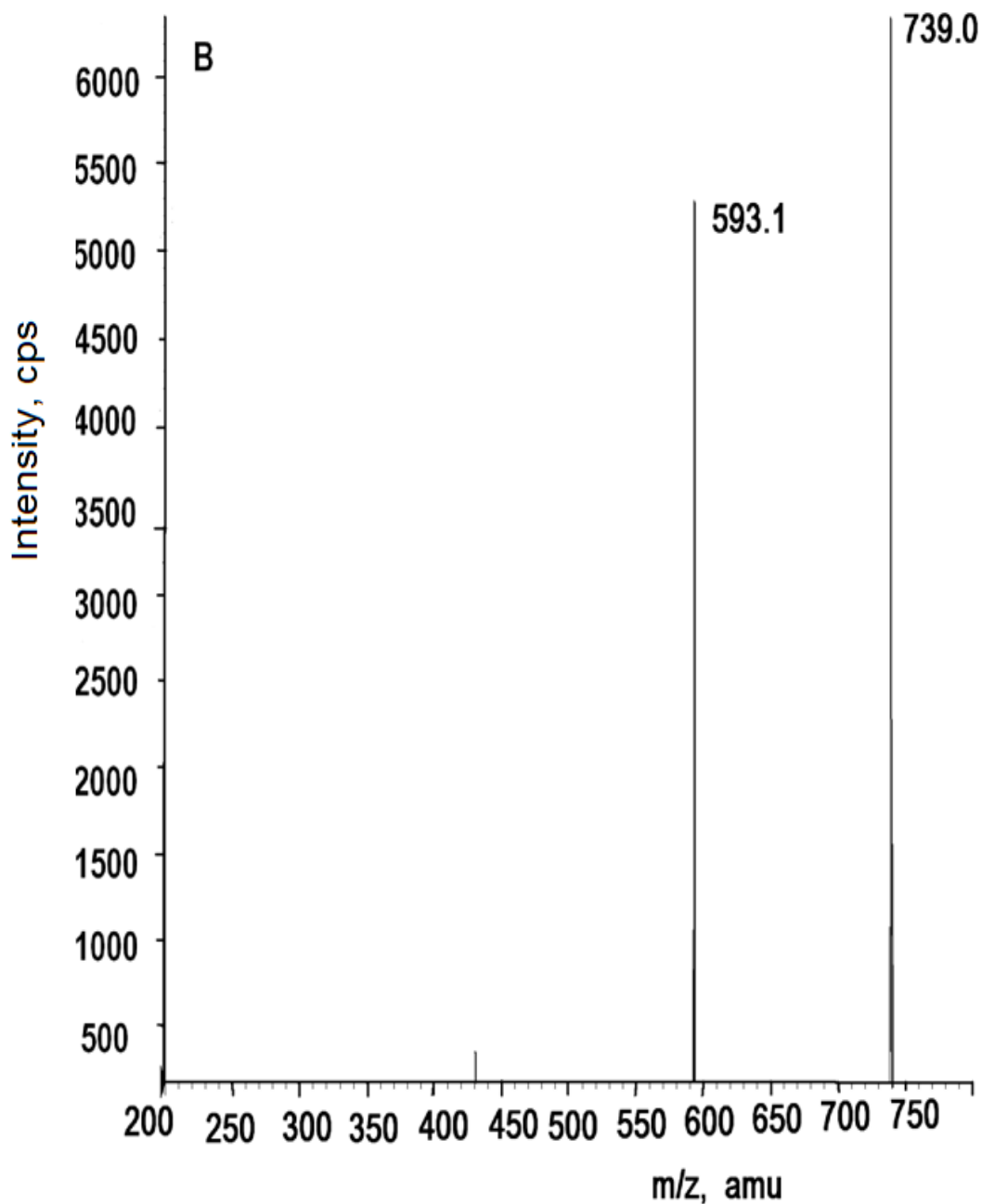
ანალიზი ჩატარდა ტანდემურ სითხურ მას-სპექტროფოტომეტრზე (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA); ქრომატოგრაფიული დაყოფა ხდებოდა XTerra MS C18 სვეტზე (2.1×100mm i.d., 3.5µm; Waters Corporation, Milford, MA, USA).

MS ანალიზის პირობები: იონის გაფრქვევის ძაბვა (an ionspray voltage) -4200V; ტემპერატურა 350°C. დეკლასტერული, ფოკუსირების და შემავალი პოტენციალი იყო -70,-300 და-10V შესაბამისად. Collision cell exit პოტენციალი-15V. ანალიზი შესრულდა უარყოფითი იონის რეჟიმში multiple reactions monitoring (MRM) გამოყენებით.

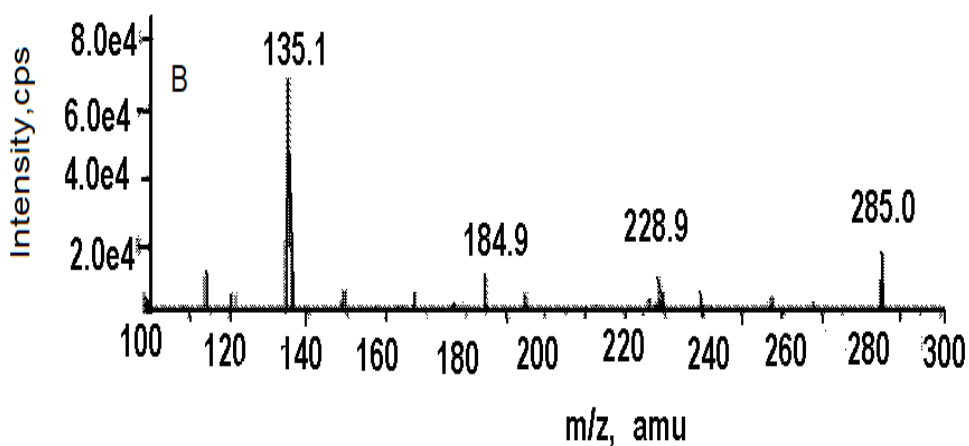
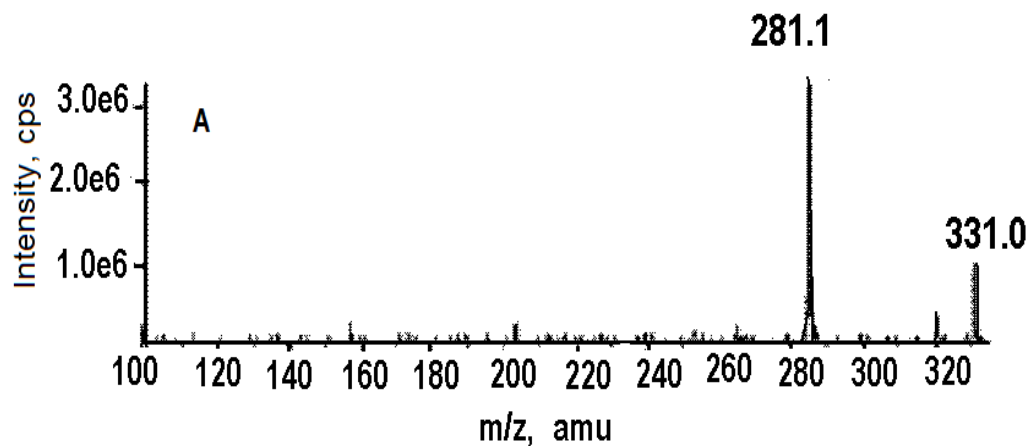
KRR-ის და მისი შიდა სტანდარტის - ფისეტინის პრეკურსორული იონებისთვის ($[M-H]^-$) დეტექტირებულ იქნა m/z 739.2 და 285.2, ხოლო ფრაგმენტული იონისთვის m/z -593 და 135.1 შესაბამისად (სურათი 2.7; 2.8 და 2.9).



სურათი 2.7. KRR-ის Q1 სრული სკანირების (A) მას-სპექტრები. მას-სპექტრის გადაღება მოხდა 1 მკგ/მლ ფისეტინის წყლიანი მეთანოლის (50:50, v/v) ხსნარის პირდაპირი ინფუზიით.



სურათი 2.8. KRR-ის პროდუქტის იონის სკანირების მას-სპექტრები. მას-სპექტრის გადაღება მოხდა 1 მკგ/მლ ფისეტინის წყლიანი მეთანოლის (50:50, v/v) ხსნარის პირდაპირი ინფუზიით.



სურათი 2.9. ფისეტინის Q1 სრული (A) და პროდუქტის იონის (B) სკანირების მას-სპექტრები. მას-სპექტრის გადაღება მოხდა 1 მკგ/მლ ფისეტინის წყლიანი მეთანოლის (50:50, v/v) ხსნარის პირდაპირი ინფუზიით.

HPLC-ხელსაწყო და ქრომატოგრაფიის პირობები

ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო Waters HPLC სისტემა (Milford, MA, USA). საკვლევის ობიექტის შიდა სტანდარტისგან ოპტიმალური დაყოფა მიღწეულ იქნა შებრუნებულ ფაზიანი სვეტის Platinum EPS C-18 (250x4,6 მმ i.d., 5მკმ, შეძენილი Alltech Associates, Inc.-დან) გამოყენებით, რომელიც ხასიათდება ფართო დიაპაზონის სელექტიურობით.

მობილური ფაზის შერჩევითი შესწავლილ იქნა სხვადასხვა ხსნარები, კერძოდ ტეტრაჰიდროფურან-მეთანოლ-იზოპროპანოლის ნარევი სხვადასხვა ბუფერული ხსნარებთან და აცეტონიტრილის წყლიანი ხსნარები. კარგი დაყოფა მიღწეულ იქნა იმ მობილური ფაზის გამოყენებით, რომელიც შედგებოდა ორი ხსნარისაგან:

ხსნარი A 5% მეთანოლი ფოსფატურ ბუფერში (pH 2.0; 0.01 M) და

ხსნარი B (ტეტრაჰიდროფურანი – იზოპროპანოლი – მეთანოლი – წყალი (150:200:67.5:32.5 v/v/v/v)).

ინჟექტორსა და ანალიზურ სვეტს შორის ჩაყენებული იყო Waters-ის დამცავი წინასვეტი.

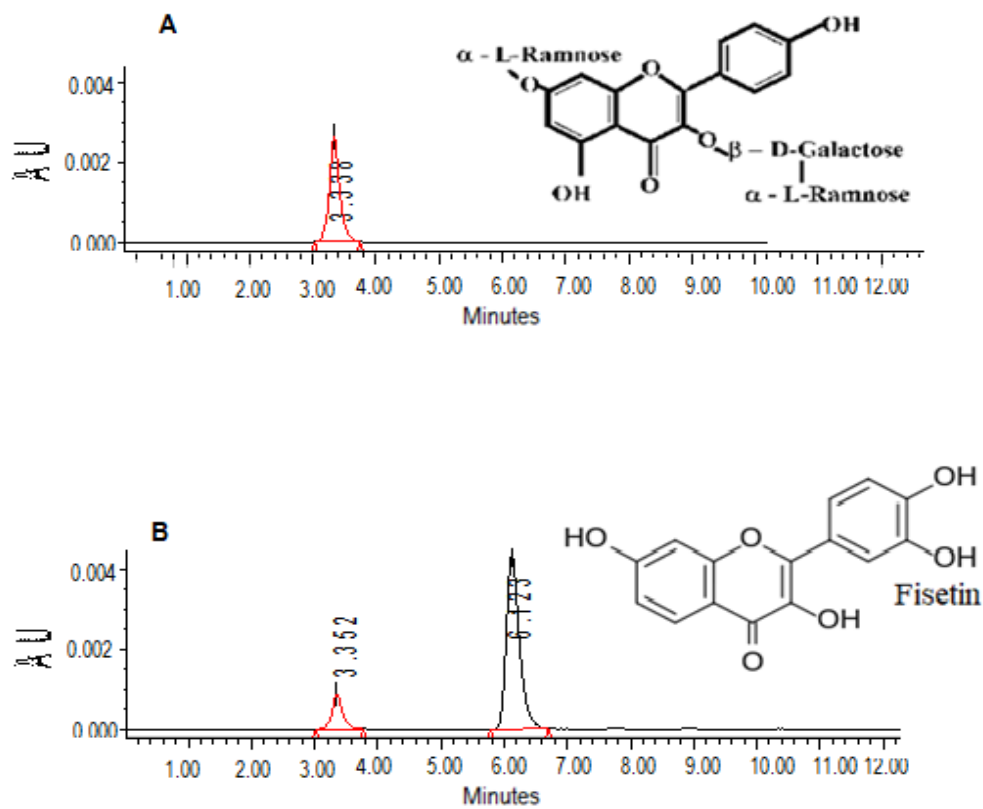
გამოყენებამდე ხდებოდა ხსნარების დე-აირაცია და გაფილტვრა 0.45 მკმ მემბრანის მქონე ფილტრში ვაკუუმის ქვეშ. HPLC-ის სვეტის გაწონასწორება ტარდებოდა 60% A და 40% B ხსნარებით.

სინჯების დაყოფა ხდებოდა იზოკრატიული გადიენტის გამოყენებით. დინების სიჩქარე 1 მლ/წთ; ანალიზის ხანგრძლივობა - 15 წთ; ნაერთების განსაზღვრა ხდებოდა 380 ნმ-ზე. ექსპერიმენტი ოთახის ტემპერატურაზე ტარდებოდა მინიმუმ სამჯერ. შიდა სტანდარტად გამოყენებული იყო ფისეტინი 20 ნგ/ მლ.

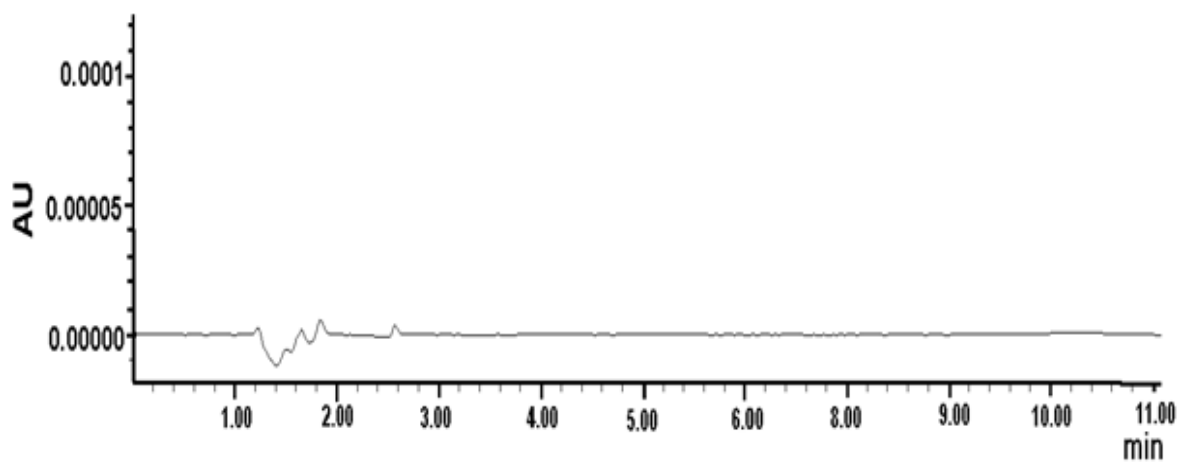
ნივთიერებების იდენტიფიცირება ხდებოდა რეტენციის (დაყოვნების) დროის მიხედვით. ამ პირობებში, KRR-ის და ფისეტინის შეკავების დრო შესაბამისად იყო 3.54; 6.45 შესაბამისად (სურათი 2.10).

KRR-ის ბიოლოგიურ სითხეებში რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდის ოპტიმიზაციისთვის გამოყენებულ იქნა Caco 2 უჯრედების ლიზატები რომლებიც მიღებულ იქნა უჯრედებზე 10 მლ 0.5% Triton X-100 დამატებით (სურათი 2.11).

საკვლევი ნივთიერება და ფისეტინი იხსნებოდა დიმეთილსულფოქსიდში (DMSO) კონცენტრაციით 1მგ/მლ და 0.25 მგ/მლ შესაბამისად და შემდეგ ნზავდებოდა მეთანოლით.



სურათი 2.10. 1 მკგ/მლ კონცენტრაციის KRR-ის (A) და ფისეტინის (B) ქრომატოგამები მობილურ ფაზაში.

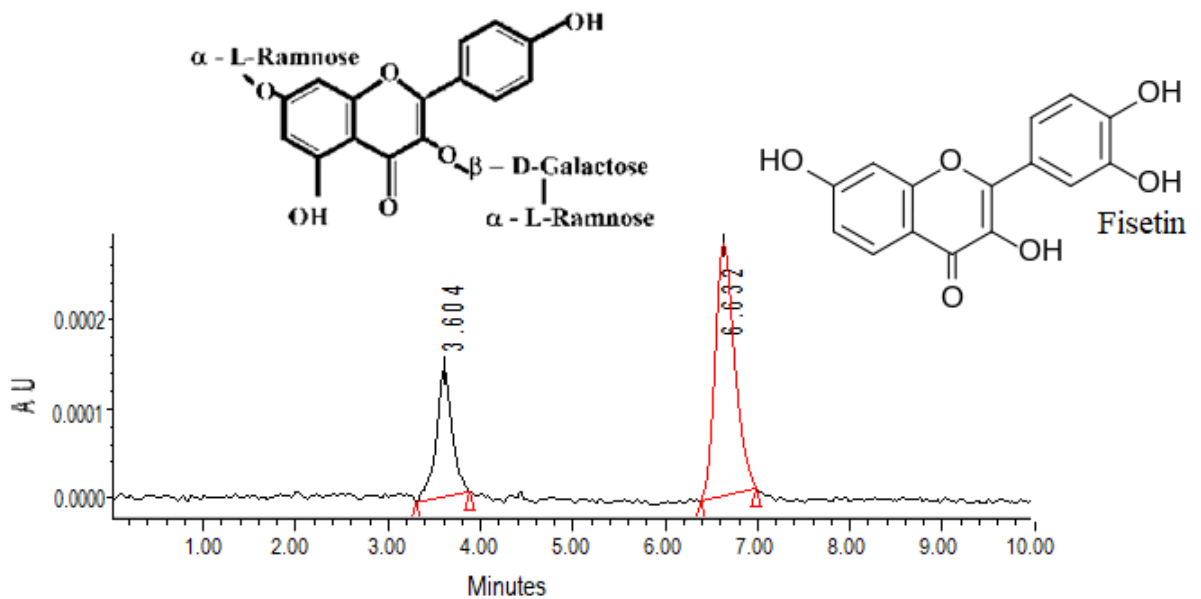


სურათი 2.11. Caco-2 უჯრედების ლიზატების ექსტრაქტის ტიპიური ქრომატოგამა

კალიბრაციის მრუდის მეთოდით ისაზღვრება უცნობ ნაერთებში კონცენტრაცია სტანდარტულ ნიმუშთან შედარების გზით. ზოგადად, გამოთვლებისთვის იყენებენ უმცირეს კვადრატთა წრფივი რეგესიის მეთოდს.

საკალიბრო მრუდის ასაგებად KRR ემატებოდა სუფთა უჯრედების ლიზირებულ ხსნარს იმგვარად, რომ მიღებულიყო შემდეგი კონცენტრაციის ხსნარები 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ნგ/მლ.

ანალიზის სიზუსტის და საიმედოობის შესაფასებლად საკვლევი ნაერთი მომზადდა სამი სხვადასხვა კონცენტრაციით (50, 100, 500 ნგ/მლ). რაოდენობრივი ანალიზი ჩატარდა 3 ჯერ დღის განმავლობაში -intra-day და 5 სხვადასხვა დღეს - inter-day (n=3) სიზუსტის და საიმედოობის შესაფასებლად.



სურათი 2.12. Caco-2 უჯრედებში აკუმულირებული 50 ნგ/მლ KRR-ის და 20 ნგ/მლ ფისეტინის ქრომატოგრამები.

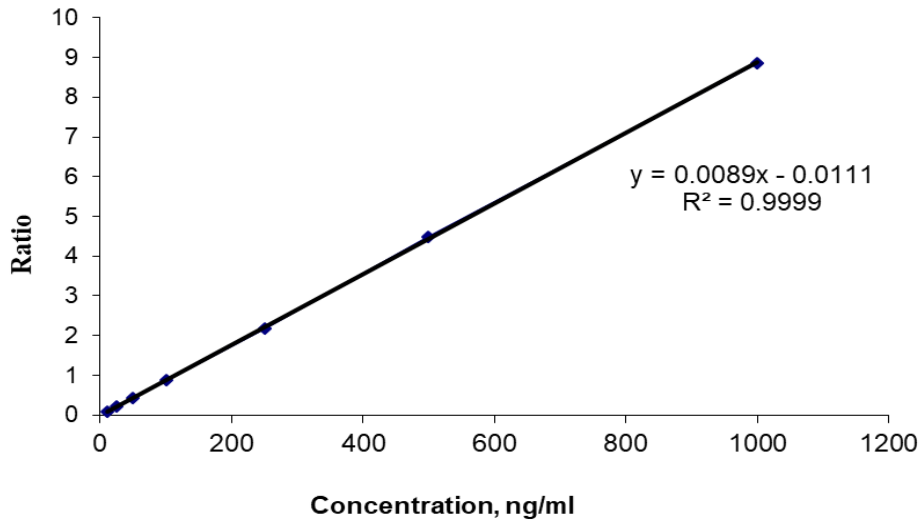
ანალიზის დაწყებამდე ნიმუშებს ემატებოდა თანაბარი მოცულობის მეთანოლი ცილების დასალექად. სინჯების ინტენსიური შენჯღრევის შემდეგ ხდებოდა 13000 rpm-ზე ცილების დაცენტრიფუგირება 10 წუთის განმავლობაში 4°C-ზე. მიღებულ ნალექზედა სითხეს ემატებოდა ორმაგი მოცულობის მეთანოლი და შიდა სტანდარტი;

აორთქლება ხდებოდა აზოტით მშრალი მასის მიღებამდე. ნაშთი იხსნებოდა 100 მკლ მობილურ ფაზაში და გამოყენებული იყო HPLC-ის ანალიზისთვის. ექსპერიმენტის მსვლელობისას არ დაფიქსირებულა ხელის შემშლელი პიკების კო-ელუირება (პიკების ერთდროული გამოსვლა) და ამ ქრომატოგრაფიულ პირობებში მიღწეულ იქნა ფლავონოიდების კარგი დაყოფა (სურათი 2.10 - 2.12). რაოდენობრივი შეფასება ეფუძნებოდა პიკის ფართობის გამოთვლას, ამავე დროს ხდებოდა სტანდარტების საკალიბრაციო მრუდის შედარება.

შედეგები და განხილვა

მეთოდის ვალიდაცია ჩატარდა სისტემის შესაბამისობის დემონსტრირებისთვის. KRR-ის (შიდა სტანდარტი - ფისეტინი) საკალიბრო მრუდი აიგო საანალიზო ნივთიერების / შიდა სტანდარტის პიკების ფართობის თანაფარდობისა და საანალიზო ნივთიერების კონცენტრაციას შორის დამოკიდებულების გაფიქციტ, რომელიც იყო სწორხაზოვანი 25 დან - 1000 ნგ/მლ კონცენტრაციის დიაპაზონში (სურათი 2.13). საკალიბრო მრუდის რეგესიის ფორმულა KRR-თვის იყო $y = 0,0089 x - 0,0111$. კორელაციის კოეფიციენტი აღმოჩნდა საკმაოდ მაღალი ($R^2 = 0,999$), რომელიც გვიჩვენებს, რომ მეთოდი UV დეტექტორში კარგ რეაგირებას ახდენს.

ანალიზის მეთოდის სიზუსტე მიუთითებს გაზომვის შედეგების სიახლოვეს ჭეშმარიტ მაჩვენებელთან და გამოისახება, როგორც ცნობილი რაოდენობის აღდგენის პროცენტი. შემუშავებული მეთოდის სიზუსტე შეფასდა უჯრედების ლიზატებში სამი ხვადასხვა კონცენტრაციის ნიმუშის ხარისხის კონტროლის ანალიზის შედეგებით. განსაზღვრა ჩატარდა სამჯერადად. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია ცხრილში 2.4. იმავე დღეს ანალიზის განმეორებით მიღებული სიზუსტის მაჩვენებლის საშუალო მნიშვნელობა იყო 102.1% KRR-თვის; სხვადასხვა დღეს ჩატარებული ანალიზის სიზუსტე იყო 98.4 -104.6% -ის ფარგლებში. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ შემუშავებული მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიული მეთოდი ხასიათდება დამაკმაყოფილებელი სიზუსტით.



სურათი 2.13. საკალიბრო მრუდი KRR-ის მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიული ანალიზისთვის უჯრედების ლიზატების ხსნარში. შიდა სტანდარტი - ფისეტინი. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

ცხრილი 2.4.

მეთოდის ვალიდაციის შედეგები

საანალიზო მიზნობრივი ნივთიერება	მიზნობრივი კონცენტრაცია (მკგ/მლ)	დღის განმავლობაში ჩატარებული ანალიზი	დღის განმავლობაში ჩატარებული ანალიზი	სხვადასხვა დღეს ჩატარებული ანალიზი			
		გაზომილი კონცენტრაცია (მკგ/მლ)	სიზუსტე* საიმედოობა, %	გაზომილი კონცენტრაცია (მკგ/მლ)	სიზუსტე* საიმედოობა, %		
KRR	0.05	0.058 \pm 0.003	116.3	4.16	0.052 \pm 0,001	103.7	1.66
	0.10	0.102 \pm 0.004	102.0	4.19	0.103 \pm 0,001	102.9	1.33
	0.50	0.495 \pm 0.021	99.1	4.23	0.502 \pm 0,012	100.3	2.35

* -სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელი

ფარდობითი სტანდარტული გადახრა (R.S.D.), რომელიც გამოიყენება საიმედოობის შესაფასებლად, საკვლევი ნიმუშისთვის იყო 5 -ის ქვევით დღის განმავლობაში, და 9 -ს ქვემოთ სხვადასხვა დღეებში განმეორებითობისას. RSD-ის დაბალი მნიშვნელობა მიუთითებს მეთოდის აღწარმოებადობასა და რეპროდუქციულობაზე.

დეტექტირების ლიმიტი (LOD), არის ნიმუშის ის უმცირესი კონცენტრაცია, რომლის აღმოჩენაც შესაძლებელია ($S/N = 10$); ჩვენს მიერ შემუშავებული ანალიზის მეთოდი 10 ნგ/მლ KRR-ის აღმოჩენის საშუალებას იძლევა.

ექსტრაქციის ეფექტურობა უჯრედების ლიზატების ხსნარიდან შეფასდა ($n=3$) საკვლევი ობიექტის სამ სხვადასხვა კონცენტრაციაში (50, 100, 500 ნგ/მლ) KRR-ის ცნობილი რაოდენობის შემცველი ექსტრაგირებული ნიმუშების და მობილურ ფაზაში იგივე კონცენტრაციის შემცველი ნივთიერების პიკის ფართობების შედარებით.

მოდრავ ფაზაში აღმოჩენილი ნივთიერების რაოდენობა მიჩნეულ იქნა 100 %-ად (სურათი 2.10). საანალიზო ნივთიერების ხსნარი უჯრედების ლიზატებში შეყვანილ იქნა მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფში ნიმუშების ზემოთ მითითებული დამუშავების შემდეგ. ექსტრაქციის ეფექტურობის საშუალო მნიშვნელობა KRR-თვის ვარირებდა 61 -დან - 70%-ის ფარგლებში.

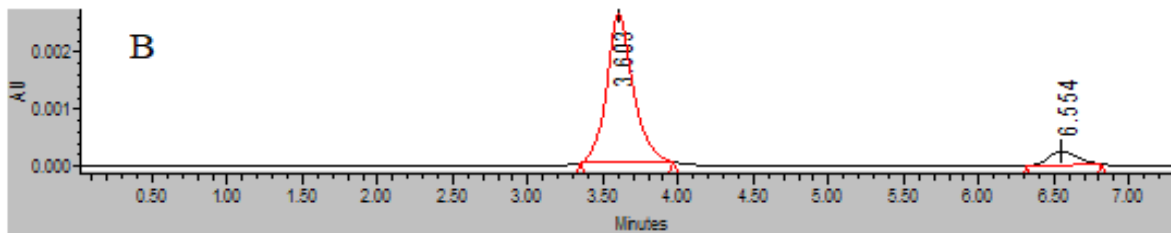
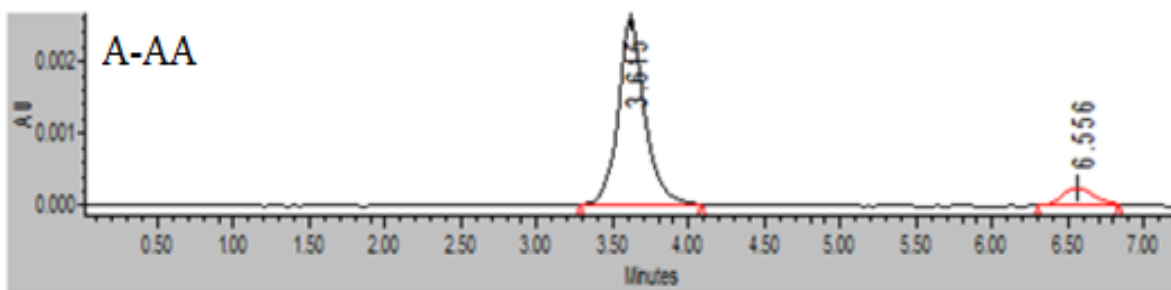
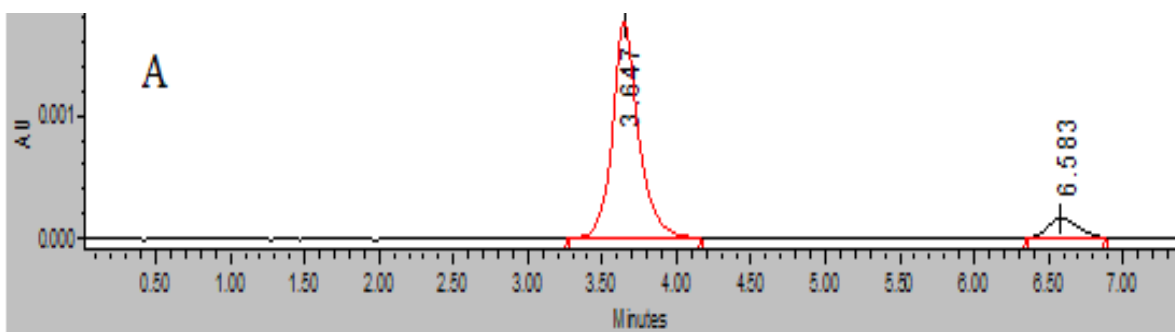
KRR-ის სტაბილურობის შესწავლა

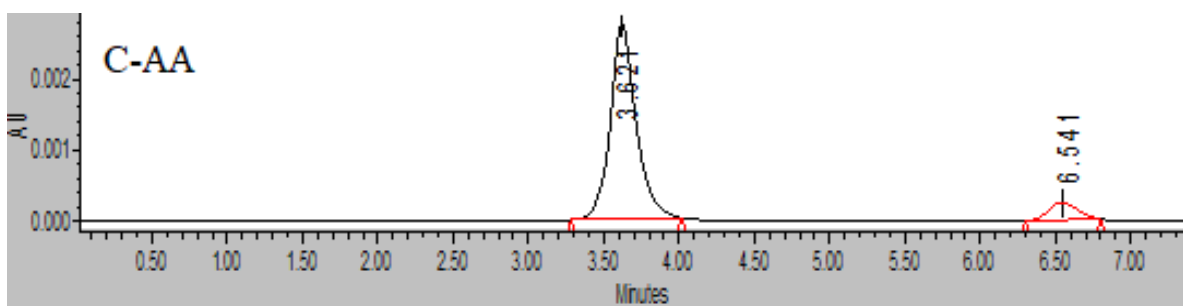
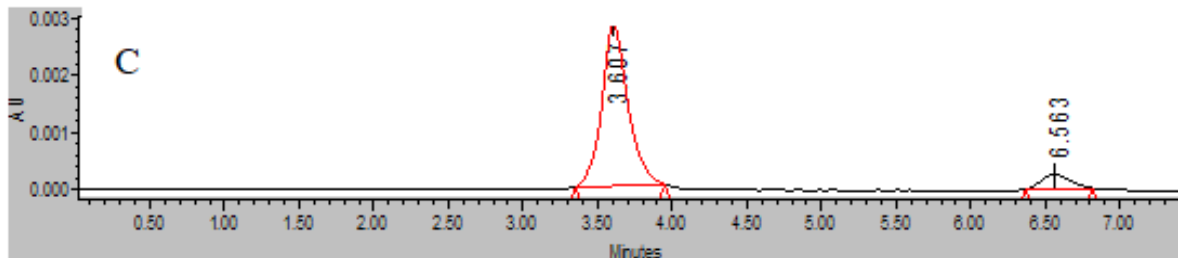
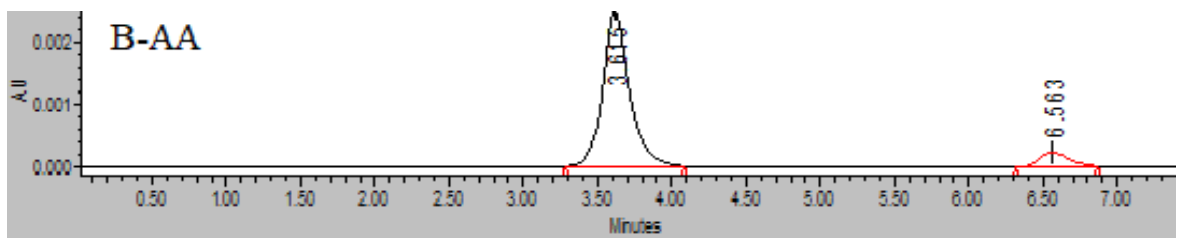
იმისათვის რომ დადგენილიყო, ექსპერიმენტის მსვლელობაში ადგილი ხომ არ ჰქონდა საკვლევი ობიექტის ჰიდროლიზს შესწავლილ იქნა KRR-ის სტაბილურობა მობილურ ფაზაში, ლიზატებსა და HEPES არეში ასკორბინის მჟავის თანაობისას და მის გარეშე.

ფლავანოიდ გლიკოზიდის სტაბილურობის გამოკვლევისთვის ექსპერიმენტი ჩატრდა საკვლევი ობიექტის ხსნარის 2 კონცენტრაციისთვის, კერძოდ 1000 და 50 ნგ/მლ. KRR გახსნილ იქნა მობილურ ფაზაში, რომელიც შედგებოდა A (5% მეთანოლი ფოსფატურ ბუფერში (pH 2.0; 0.01 M)) /B (ტეტრაჰიდროფურანი –იზოპროპანოლი-მეთანოლი-წყალი (150:200:67.5:32.5 v/v/v)) - 60/40. ნიმუშები ინახებოდა ოთახის, 4°C და -20°C ტემპერატურებზე. რაოდენობრივი ანალიზი ჩატრდა 3 დღის შემდეგ; შიდა

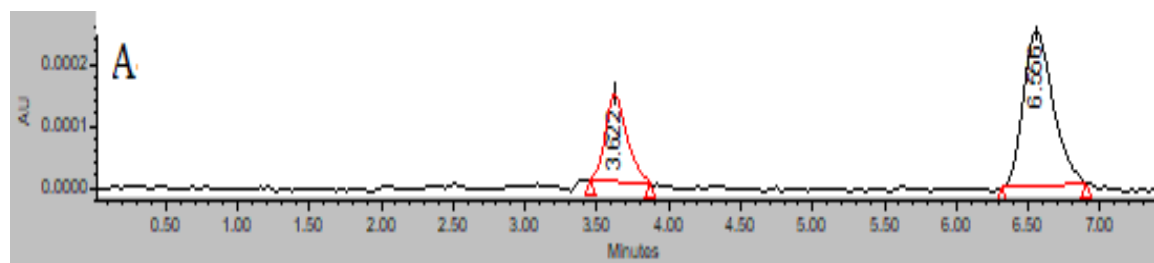
სტანდარტად გამოყენებული იყო 20 ნგ/მლ ფისექტინი. ფლავონოიდის სტაბილურობა გამოისახებოდა როგორც აღდგენის სიდიდე, რომელიც ნივთიერების საწყისი რაოდენობის პროცენტს წარმოადგენდა (სურათი 2.14-2.15). გაფიკზე მოცემულია მინიმუმ 3 განსაზღვრის შედეგი (სურათი 2.16).

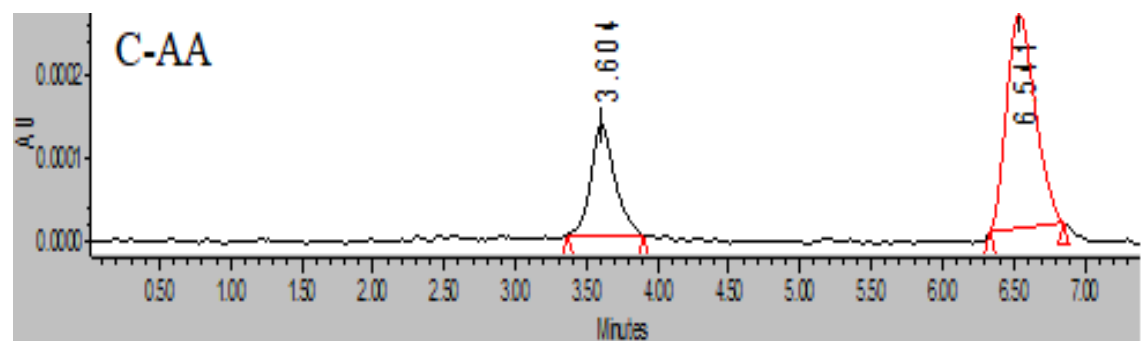
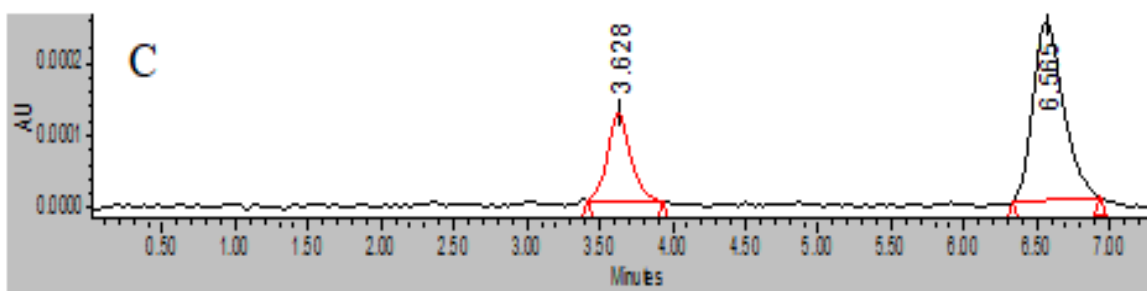
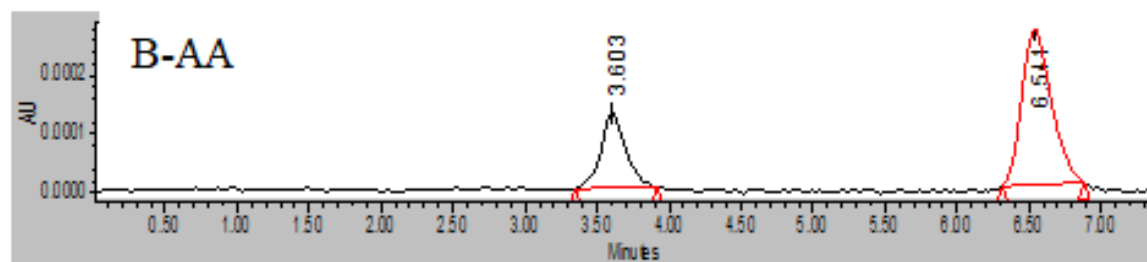
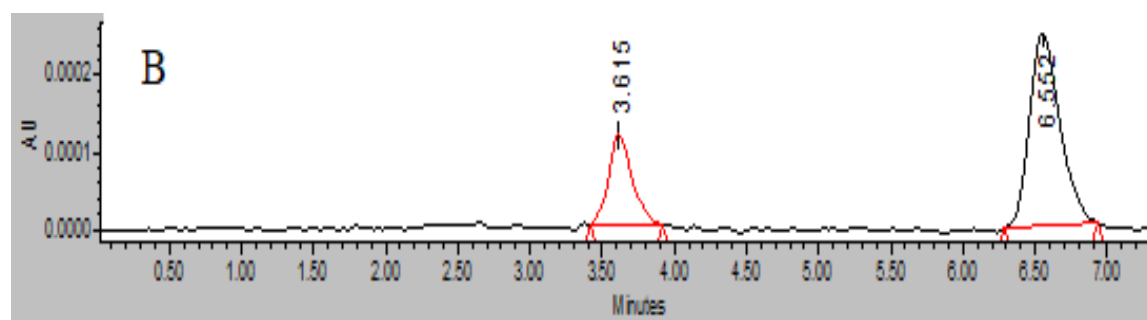
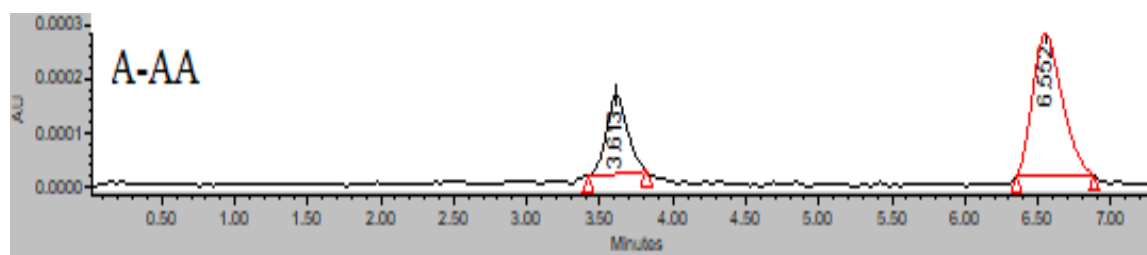
დადგენილ იქნა, რომ KRR სტაბილურია შენახვის სხსხ პირობებში და ასკორბინის მჟავა დიდ გავლენას არ ახდენს მის სტაბილურობაზე. ფლავანოიდის საშუალო რე-დეტექტირების ზღვარი იყო 76.9-97 % -ის და 97.7-102.2 % ის ფარგლებში შესაბამისად 50 და 100 ნგ/მლ კონცენტრაციებისთვის (სურათები 2.14-2.16).





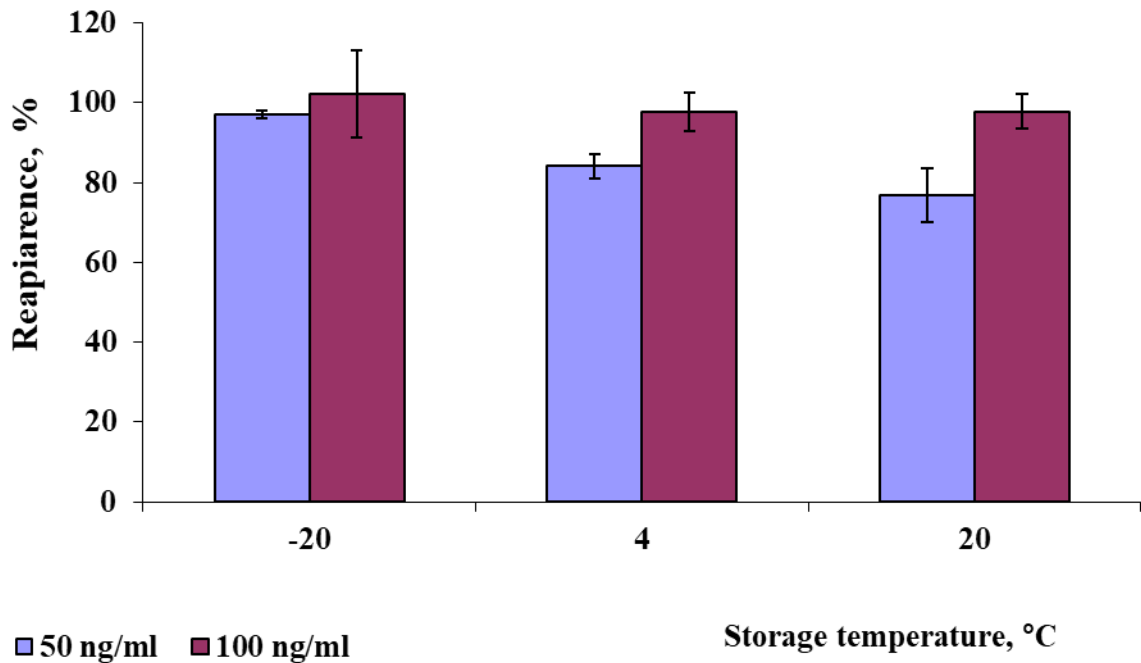
სურათი 2.14. KRR-ის (100 ნგ/მლ) ქრომატოგამები მობილურ ფაზაში 1 მმოლი ასკორბინის მჟავის (AA) თანაობისას და მის გარეშე: (A; A-AA) KRR-ის ქრომატოგამა 20°C -ზე; (B; B-AA) KRR-ის ქრომატოგამა 4°C -ზე; (C; C-AA) KRR-ის ქრომატოგამა -20°C -ზე. შიდა სტანდარტი - ფისეტინი 20 ნგ/ მლ. მობილური ფაზა - A: 5% მეთანოლი ფოსფატურ უფერში (pH 2.0; 0.01 M) და B: ტეტრაჰიდროფურანი –ოზოპროპანოლი-მეთანოლი-წყალი (150:200:67.5:32.5 v/v/v/v).





სურათი 2.15. KRR-ის (50 ნგ/მლ) ქრომატოგამები ლიზატებში 1 მმოლი ასკორბინის მჟავის (AA) თანაობისას და მის გარეშე; (A; A-AA) KRR-ის ქრომატოგამა 20°C -ზე; (B; B-AA) KRR-ის ქრომატოგამა 4°C -ზე; (C; C-AA)KRR-ის ქრომატოგამა -20°C -ზე. შიდა სტანდარტი - ფისეტინი 20 ნგ/ მლ. მობილური ფაზა - A: 5% მეთანოლი ფოსფატურ ბუფერში (pH 2.0; 0.01 M) და B: ტეტრაჰიდროფურანი – იზოპროპანოლი-მეთანოლი-წყალი (150:200:67.5:32.5 v/v/v/v).

შესწავლილ იქნა აგრეთვე ასკორბინის მჟავის თანაობისას და მის გარეშე KRR-ის სტაბილურობა HEPES ბუფერულ ხსნარში (pH 6.8), რომელიც გამოიყენებოდა უჯრედებში KRR-ის აბსორბციის კვლევისას.

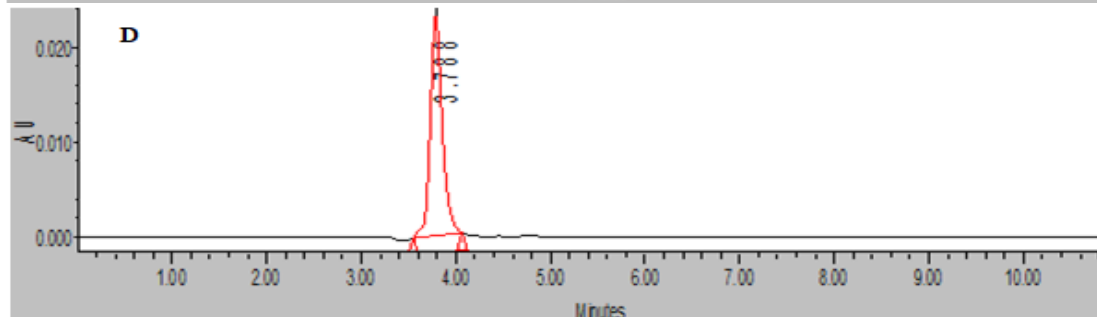
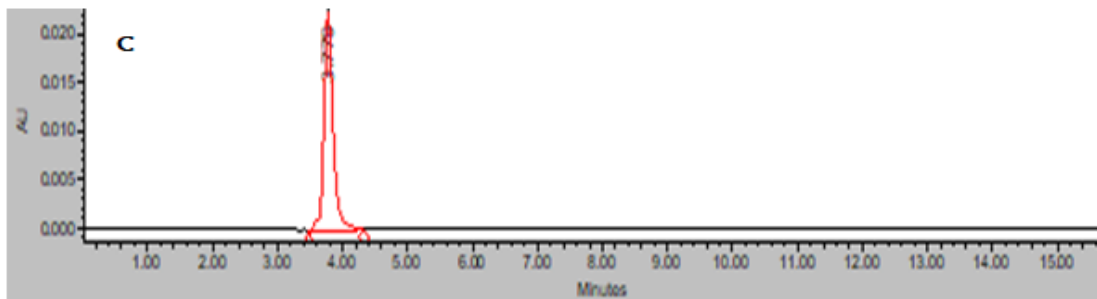
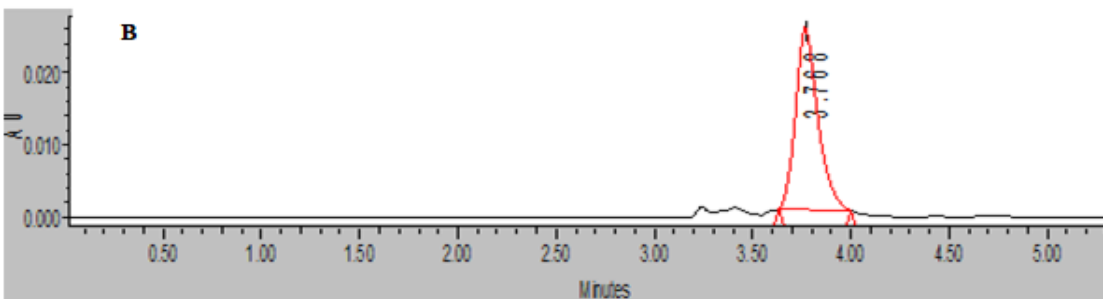
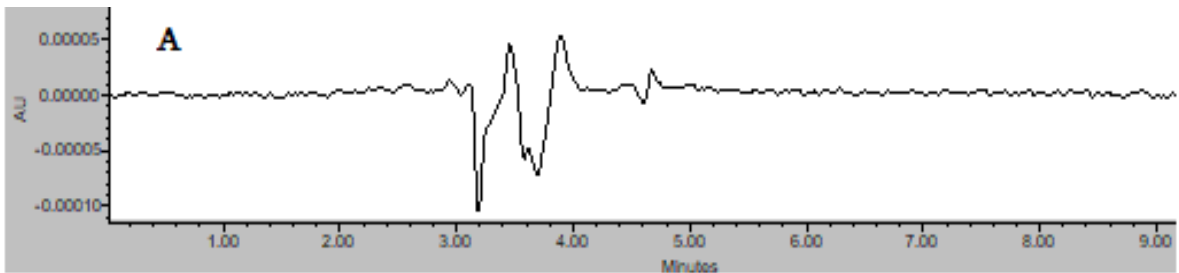


სურათი 2.16. შენახვის ტემპერატურის გავლენა KRR-ის (50 ნგ/მლ და 100 ნგ/მლ) სტაბილურობაზე მობილურ ფაზაში (A: 5% მეთანოლი ფოსფატურ ბუფერში (pH 2.0; 0.01 M) და B: ტეტრაჰიდროფურანი – იზოპროპანოლი-მეთანოლი-წყალი 150:200:67.5:32.5 /v/v/v/v)). თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია ± SD.

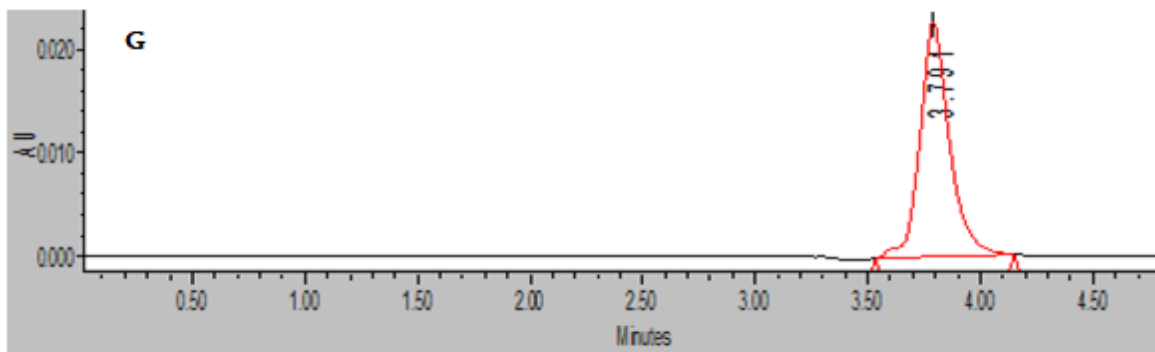
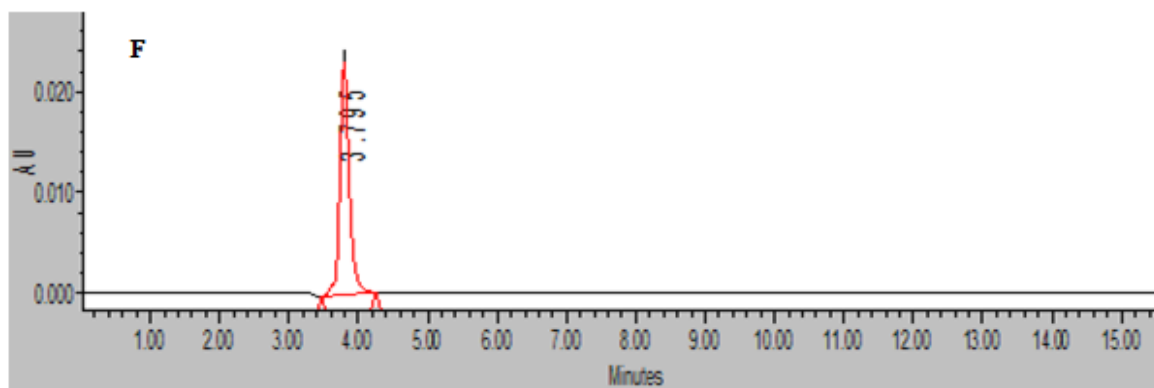
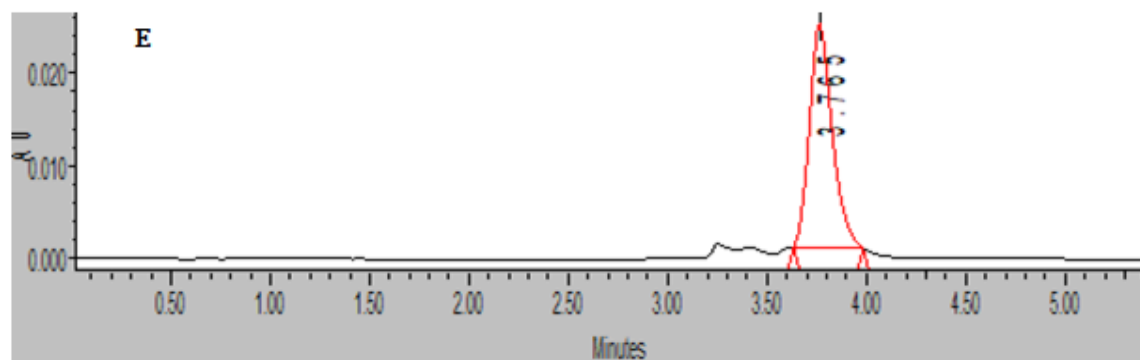
მომზადებულ იქნა 10 მკმ კონცენტრაციის KRR-ის ხსნარი HEPES ბუფერში (pH 6.8). ნიმუშები ინახებოდა 95% ჟანგბადის და 5% CO₂ -ის პირობებში 37°C ტემპერატურაზე ინკუბატორში.

ინკუბაცია მიმდინარეობდა 1 ან 2 სთ-ის განმავლობაში და KRR-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა ხდებოდა მაღალეფექტური სითხოვანი ქრომატოგრაფიით. საანალიზო ნიმუშის რაოდენობა იყო 20 მკლ; შიდა სტანდარტად გამოყენებული იყო 20 ნგ/ მლ ფისეტინი. გრაფიკზე მოცემულია მინიმუმ 3 განსაზღვრის შედეგი.

ჩატარებული კვლევის შედეგების მიხედვით საკვლევ ობიექტში (სურათი 2.17-2.19) რაიმე მნიშვნელოვანი ცვლილებები არ დაფიქსირებულა.

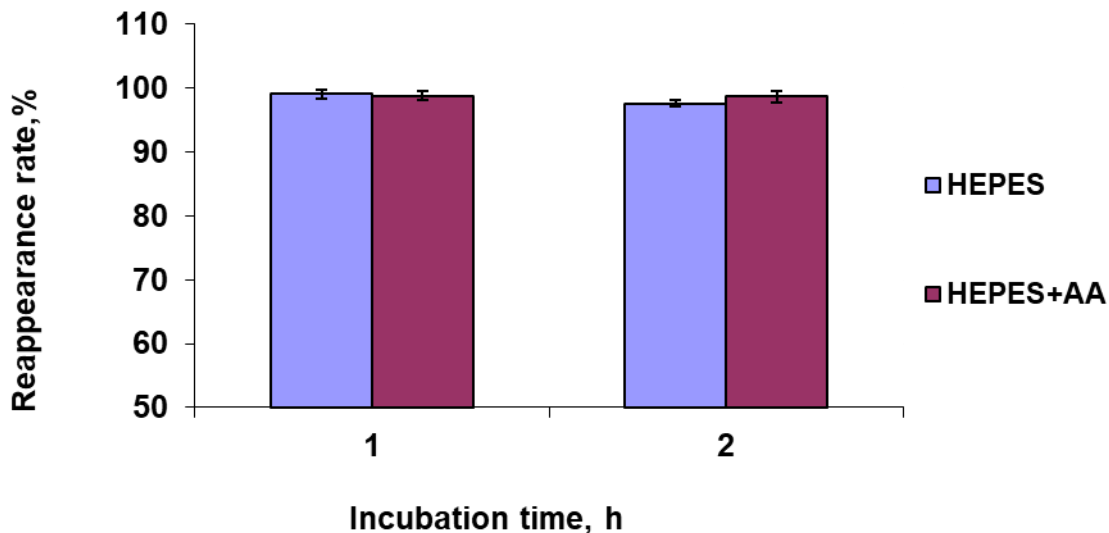


სურათი 2.17. 10 mM KRR-ის ქრომატოგამები HEPES არეში. (A) HEPES -ის ქრომატოგამა; (B) KRR-ის ქრომატოგამა HEPES არეში; (C) KRR-ის ქრომატოგამა HEPES-ში 1 საათი ინკუბაციისას 37°C -ზე; (D) KRR-ის ქრომატოგამა HEPES -ში 2 საათი ინკუბაციისას 37°C -ზე; მობილური ფაზა შედგებოდა - A: 5% მეთანოლი ფოსფატურ უფერში (pH 2.0; 0.01 M) და B: ტეტრაჰიდროფურანი – იზოპროპანოლი-მეთანოლი-წყალი (150:200:67.5:32.5 v/v/v) 60:40 (A: B) თანაფარდობით; ნაკადის სიჩქარე 1.0 მლ/წთ.



სურათი 2.18. 10 μ M KRR-ის ქრომატოგამები HEPES არეში. (E) KRR-ის ქრომატოგამა (HEPES არეში 1 mM ასკორბინის მჟავის თანაობისას; (F) KRR-ის

ქრომატოგამა HEPES -ში 1mM ასკორბინის მჟავის თანაობისას 1 საათი ინკუბაციისას 37°C -ზე; (G)KRR-ის ქრომატოგამა HEPES -ში 1mM ასკორბინის მჟავის თანაობისას 2 საათი ინკუბაციისას 37°C -ზე. მობილური ფაზა შედგებოდა - A: 5% მეთანოლი ფოსფატურ ბუფერში (pH 2.0; 0.01 M) და B:ტეტრაჰიდროფურანი – იზოპროპანოლი-მეთანოლი-წყალი (150:200:67.5:32.5 v/v/v/v)60:40 (A: B) თანაფარდობით; ნაკადის სიჩქარე 1.0 ml/min.



სურათი 2.19. 10 μ M KRR-ის სტაბილურობა HEPES არეში 1mM ასკორბინის მჟავის თანაობისას ან მის გარეშე. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

დადგენილ იქნა, რომ KRR სტაბილურია HEPES ხსნარში 1-2 სთ-ის განმავლობაში ინკუბაციისას და ასკორბინის მჟავა დიდ გავლენას არ ახდენს მის სტაბილურობაზე. ფლავანოიდის საშუალო რე-დეტექტირების ზღვარი იყო 97.64-99.1% -ის და 98.67-98.82% ის ფარგლებში შესაბამისად ასკორბინის მჟავის გარეშე და მისი თანაობისას.

შედეგები:

1. ჩვენს მიერ შემუშავდა KRR-ის HPLC რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდი ბიოლოგიურ სითხეებში;

2. შემუშავებული მეთოდის ქრომატოგრაფიული პარამეტრები ადასტურებს შერჩეული სისტემის ვარგისიანობას (შესაბამისობას).

3. მეთოდი ვალიდირებულია მისი შესაბამისი მახასიათებლებით, დადასტურებულია მაღალი სელექტიურობა, საიმედოობა და სიზუსტე. იმავე დღეს ანალიზის განმეორებით მიღებული სიზუსტის მაჩვენებლის საშუალო მნიშვნელობა იყო 102.1%, R.S.D <5; ხოლო სხვადასხვა დღეს ჩატარებული ანალიზის სიზუსტე იყო 98.4 -104.6% -ის ფარგლებში; R.S.D <9. დეტექტირების ლიმიტი (LOD) = 10ნგ/მლ.

4. შესწავლილ იქნა KRR-ის სტაბილურობა საკვლევი არეებში ასკორბინის მჟავის თანაობისას და მის გარეშე. დადგინდა, რომ საკვლევი ნივთიერება სტაბილურია ექსპერიმენტის მსვლელობისას და ასკორბინის მჟავა დიდ გავლენას არ ახდენს მის სტაბილურობაზე.

5. KRR-ის საშუალო რე-დეტექტირების ზღვარი 97.64-99.1% -ის და 98.67-98.82% ის ფარგლებში იყო მოთავსებული შესაბამისად ასკორბინის მჟავის გარეშე და მისი თანაობისას.

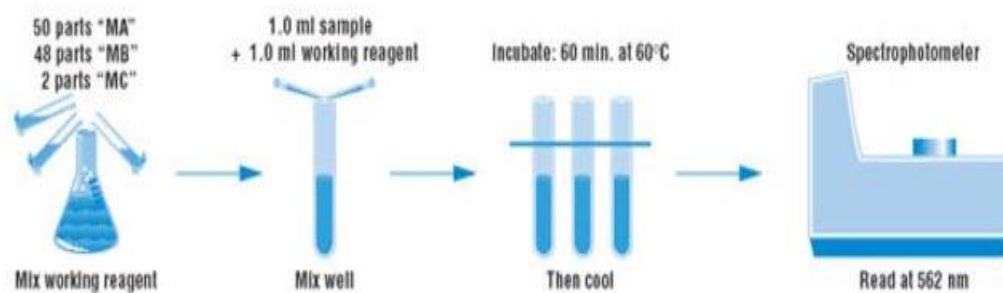
თავი 2. 4 KRR-ის ბიოშელწევადობის შესწავლა *in-vitro* ექსპერიმენტში

ფლავონოიდები - მცენარეულ სამყაროში ფართოდ გავრცელებული ბუნებრივი ანტიოქსიდანტების დიდი ჯგუფია, რომლებიც ასევე ავლენენ ისეთ ფარმაკოლოგიურ თვისებებს როგორცაა ანთების საწინააღმდეგო, ჰეპატოპროტექტორული, ნეფროპროტექტორული, ანტივირუსული, და ა.შ. ამიტომაც მათი შესწავლა აქტიურად ხორციელდებოდა წარსულშიც და აწმყოშიც (Kumar et al., 2013). მიუხედავად მრავალმხრივი ფარმაკოლოგიური ეფექტებისა სხვადასხვა კვლევებით დადასტურდა, რომ პერორალური მიღებისას ისინი ავლენენ გარკვეულ ნაკლოვანებებს, რომლებიც დაკავშირებულია სტაბილურობასთან, ბიოშელწევადობასა და ბიოეფექტურობასთან (Ma et al., 2014). ექსტრაქტების შემადგენელი ბიოლოგიურად აქტიური კომპონენტების უმრავლესობა, მაგ. ფლავონოიდები, წყალში კარგად ხსნადი ნივთიერებებია, მაგრამ

ხასიათებიან ორგანიზმში დაბალი შეწოვისუნარიით რადგანაც მათ უნარი არ შესწევთ გადალახონ უჯრედის ლიპიდურ მემბრანა, აქვთ მეტისმეტად დიდი მოლეკულური ზომა, ან ცუდად აბსორბირდებიან, რაც ამცირებს მათ ბიომეღწევადობასა და ეფექტურობას. ზოგიერთი ფენოლები კლინიკურად არ გამოიყენება ამ წინააღმდეგობების გამო.

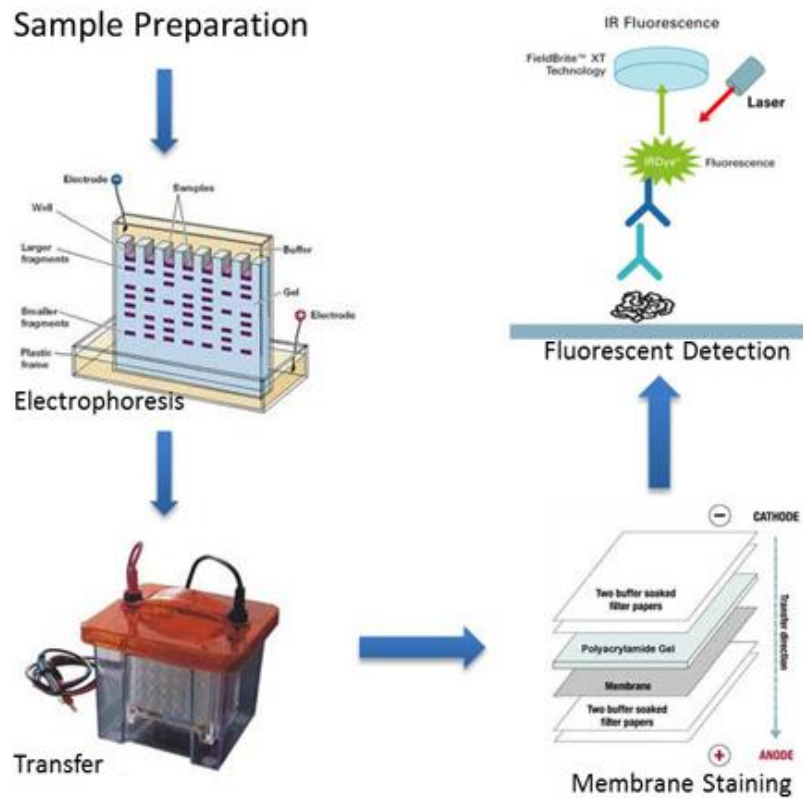
ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის -კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7-რამნოზიდის (KRR) ნაწლავური შეღწევადობის შესწავლა ადამიანის კოლინჯის ადენოკარცინომულ ურედების (Caco-2), როგორც ნაწლავის ბარიერის მოდელის გამოყენებით (Sambuy et al., 2005). ნაწლავური შეწოვის შესწავლისათვის Caco-2 უჯრედები ფართოდ გამოიყენება მისი განსაკუთრებული უნარის გამო - მოდელირება გაუკეთოს ადამიანის აბსორბციის მახასიათებლებს და გამოხატოს განვითარებული ენტეროციტის რამდენიმე მორფოლოგიური და ფუნქციური თვისება.

ვესტერნ ბლოტინგის ანალიზი - P-გპ ექსპრესიის დემონსტრირება Caco-2 უჯრედებში მოხდა ვესტერნ ბლოტინგის ანალიზის გამოყენებით. ექსპერიმენტში გამოყენებული იქნა MCF-7/სენსიტიური და MCF-7/ADR უჯრედები, განთესვის რიცხვით 9-დან-18-მდე; და Caco-2 უჯრედები, განთესვის რიცხვით 83-დან - 87-მდე. უჯრედები შეგოვებულ იქნა უჯრედის სკარპერით და ჰომოგენიზებულ იქნა ყინულზე ლიზირების ბუფერულ ხსნარში, რომლიც შედგებოდა 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 და 1%-იანი პროტეაზას ინჰიბიტორული კოქტილისგან (1:100). ხსნადი ექსტრაქტები მიიღებოდა უჯრედის ლიზატების ცენტრიფუგირებით 14000 rpm-ზე 10 წუთის განმავლობაში. ცილების კონცენტრაცია ლიზატებში ისაზღვრებოდა ცილის განსაზღვრის ბიცინქონინის მჟავის (BCA) კიტ-ნაკრებით (Thermo Fisher Scientific Inc. (USA) (სურათი 2.20).



სურათი 2.20. BCA კიტნაკრებით ანალიზის პროცედურის სქემა

ცილების წინასწარ განსაზღვრული რაოდენობის (50 μ g) ელექტროფორეზირება ჩატარდა 8% SDS - პოლიაკრილამიდის გელში და ელექტრობლოტირება მოხდა ნიტროცელულოზის მემბრანაში (Invitrogen, Grand Island, NY). მემბრანების ბლოკირება ტარდებოდა 4°C-ზე მთელი ღამით დაყოვნებით ტრის-ბუფერულ ფიზიოლოგიურ ხსნარში, რომელიც შედგებოდა 0.2% (v/v) Tween 20 და 5% (w/v) უცხიმო მშრალი რძისგან. იმუნობლოტირების ანალიზი ჩატარდა ანტი - P-gp მონოკლონური პირველადი ანტისხეულის C-219-ით (Abcam. Inc. Cambridge, MA), პროპორციით 1:150, რასაც მოჰყვებოდა მეორადი ანტისხეული (horseradish peroxidase-conjugated antimouse immunoglobulin (Amersham, Piscataway, NJ)) განზავებით 1:1500. ცილების ვიზუალიზაცია ხდებოდა ECL რეაქტივით (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ). გამოყენებული იქნა 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak, Rochester, NY), რათა მოგვეხდინა ვესტერნ ბლოტინგის შედეგების ანალიზი (სურათი 2.21). MCF-7/სენსიტიური და MCF-7/ADR უჯრედების ლიზატები გამოყენებულ იქნა როგორც P-gp-ის უარყოფითი და დადებითი კონტროლი.

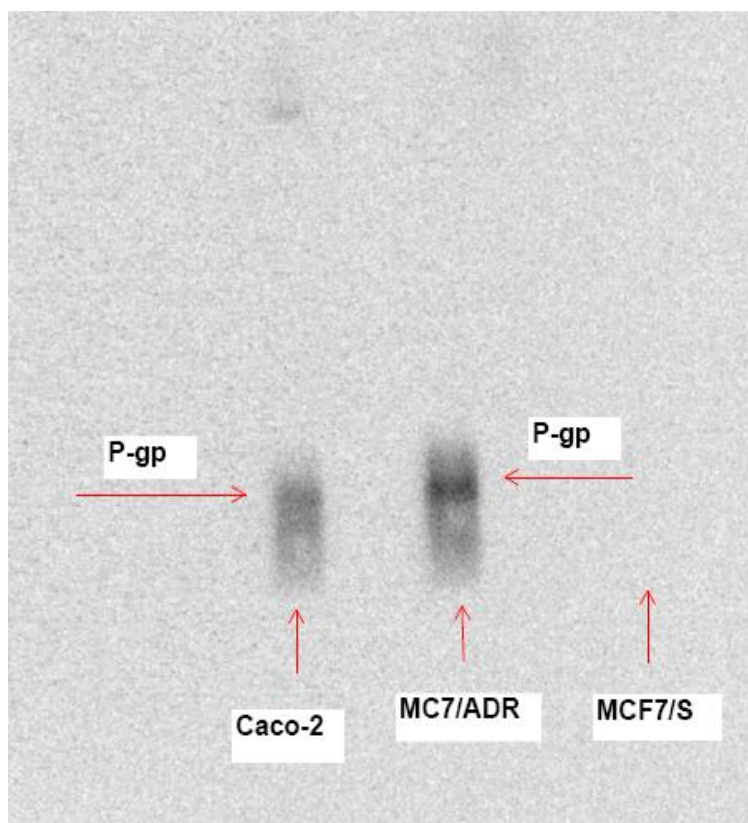


სურათი 2.21 ვესტერნ ბლოტინგის ანალიზის ეტაპები

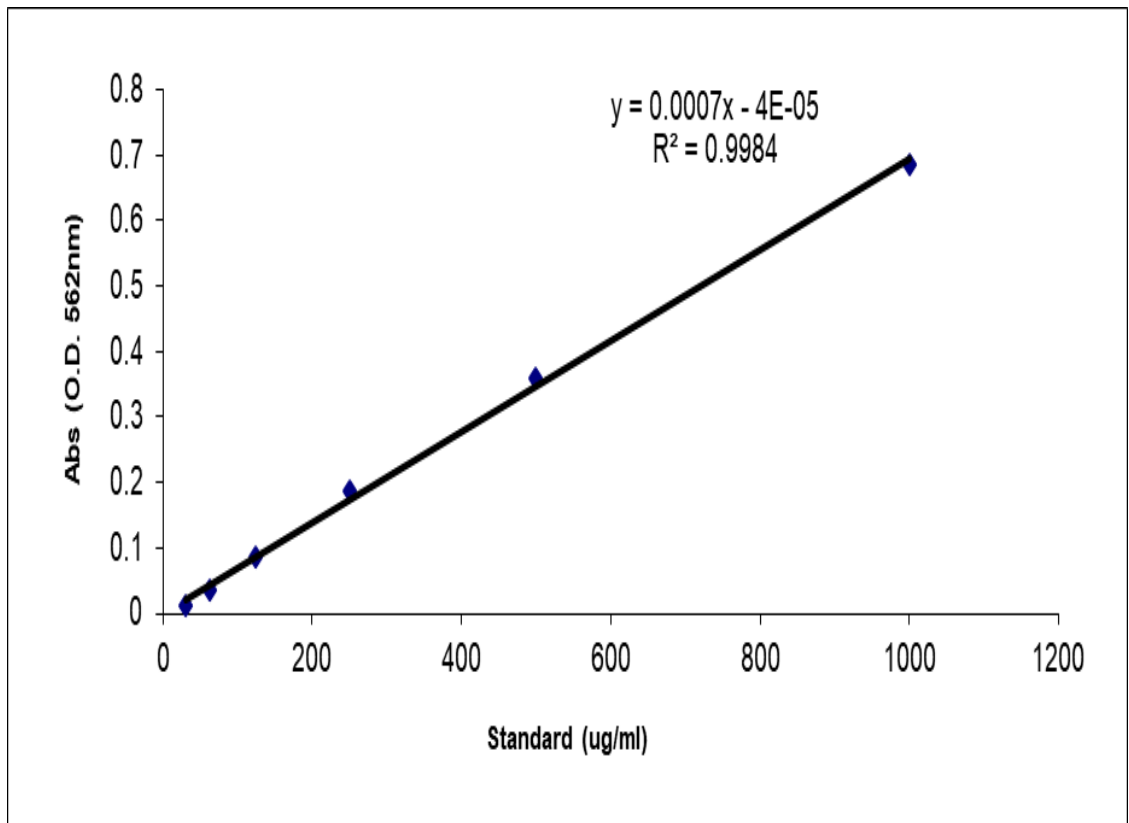
ძლიერად ინდუცირებული / კონცენტრირებული უჯრედული (MCF-7 / მგმნობიარე; MCF-7 / ADR; Caco-2) პრეპარატები გამოიყენებოდა შედარებითი სტანდარტული მრუდის ასაგებად ცილების სხვადასხვა ცნობილი საერთო კონცენტრაციებისთვის (დიაპაზონის წრფივი სიგნალი 1500 მკგ / მლ-მდე). კალიბრაციის მრუდის საშუალებით შესაძლებელია ნიმუშებში P-გპ -ის ფარდობითი შემცველობის შედარება. კორელაციის კოეფიციენტის გამოთვლა ხდებოდა კარგი სწორხაზოვნების მიღებისას (R^2 მნიშვნელობა).

შედეგები და განხილვა: KRR-ის უჯრედულ ათვისებაში P-გპ-ის ჩართულობის გამოკვლევამდე თავდაპირველად ვესტერნ ბლოტინგის ანალიზით დადგინდა P-გპ-ის ექსპრესია იმ უჯრედებში, რომლებიც გამოყენებული იყვნენ წარმოდგენილ კვლევებში. MCF-7/სენსიტიური და MCF-7/ADR უჯრედები წარმოდგენილი იყო P-გპ-ის როგორც ნეგატიური და პოზიტიური კონტროლი. როგორც სურათი 2.22-დან ჩანს, MCF-7/სენსიტიურ უჯრედებში P-გპ ექსპრესიის დეტექტირება არ მოხდა, რაც

კორელაციაშია სხვა კვლევებთან (Fairchild et al., 1990); თუმცა, P-gp ზე-ექსპრესია აღინიშნება Caco-2 უჯრედებსა (განთესვის რიგი 84; 24 დღე) და MCF-7/ADR უჯრედებში, რომლებიც დადებით კონტროლად იქნა გამოყენებული, რაც ასევე შეესაბამება წინა დაკვირვებების მონაცემებს (Fairchild et al., 1990).



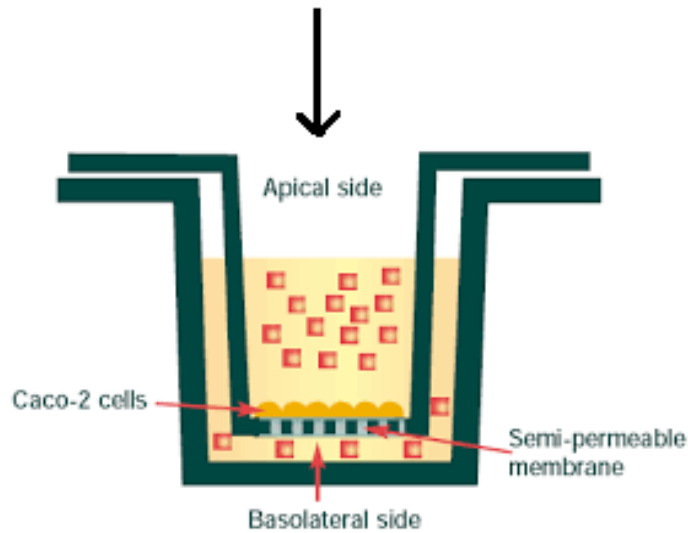
სურათი 2.22 P-gp-ის ექსპრესია MCF-7/სენსიტიური, MCF-7/ADR და Caco-2 უჯრედებში



სურათი 2.23 P-gp რაოდენობრივი განსაზღვრა ვესტერნ ბლოტინგით.

სტანდარტული მრუდის საშუალებით განსაზღვრულ იქნა იმუნობლოტინგური ნიმუშები. საკალიბრო მრუდი სწორხაზოვანი იყო სტანდარტის 1500 მკგ /მლ-მდე; ყველა ნიმუში განზავებული იყო აღნიშნულ დიაპაზონში (სურათი 2.23).

კვლევის შემდგომ ეტაპს წარმოადგენდა KRR-ის ბიოშელწვევადობის შესწავლა Caco-2 მონოშირიან უჯრედებში, რომლებშიც ჩვენს მიერ დადასტურებული იყო P-gp ზე-ექსპრესია; უჯრედების კულტივირება ხდებოდა 24 დღის განმავლობაში. ექსპერიმენტში გამოიყენებოდა ის უჯრედები, რომელთა TEER-ის მნიშვნელობა იყო 500 - 600 Ω cm² ფარგლებში. ყველა ექსპერიმენტის დაწყებამდე Caco-2 უჯრედი ირეცხებოდა მარილ შემცველი ფოსფატური ბუფერით (pH 6.8). ორმხრივი ტრანსპორტირების ექსპერიმენტი (სქემა 2.4), ე.ი. აპიკალური ნაწილიდან → ბაზოლატერული (AP→ BL) და ბაზოლატერულიდან → აპიკალური (BL →AP) მხარეს, ჩატარდა მინიმუმ სამჯერ; საკვლევი ობიექტის კონცენტრაცია იყო 20 მკგ/მლ.



სქემა 2.4. Caco-2 ბიომულწევადობის შესწავლის მეთოდი

ტრანსპორტირების ექსპერიმენტის მსვლელობისას საკნის ორივე მხარეს MEM-ის ჩანაცვლება მოხდა HEPES ბუფერით (pH 6.8). საკვლევი ხსნარი ემატებოდა დონორ მხარეს აბსორბციული (AP→BL), ხოლო რეციპიენტ მხარეს ბაზოლატერული (BL→AP) ტრანსპორტირებისთვის. TEER-ს გაზომვა ხდებოდა საათში ერთხელ; აქცეპტორის მხრიდან ნიმუშების აღება 200 მკლ ოდენობით და სატრანსპორტო არით ჩანაცვლება ასევე ხდებოდა საათობრივად.

კვლევის დასრულებისას, მოხდა სატრანსპორტო არის ფრთხილი მოცილება, Caco-2 უჯრედების ჩარეცხვა მარილშემცველი ფოსფატური ბუფერით (pH 6.8) და საკულტივაციო არის დამატება. Caco-2 უჯრედები დატოვებულ იქნა რეგენერაციისათვის შემდგომი 24 საათით CO₂ ინკუბატორში.

საკვლევი ნიმუშების ცენტრიფუგირება მოხდა 15000 გ სიჩქარეზე 5 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე; 50 მკლ ნალექზედა სითხის ანალიზი ჩატარდა HPLC მეთოდით. აბსორბირებული საკვლევი ნაერთის რაოდენობრივი განსაზღვრა მოხდა უკვე აღწერილი რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდის მიხედვით (კვარაცხელია თ., წიკლაური ლ. 2016).

KRR-ს ტრანსპორტირების ინჰიბირების შესწავლა ჩატარდა P-gp-ის საყოველთაოდ ცნობილი ინჰიბიტორის - ვერაპამილის (100 μ M) გამოყენებით; ექსპერიმენტში გამოიყენებოდა მისი ახლად მომზადებული ხსნარი. ვერაპამილი იხსნებოდა საინკუბაციო არეში და ემატებოდა საკნის აპიკალურ ან ბაზოლატერულ მხარეს. KRR-ის ერთმხრივი ტრანსპორტირება და სრული შეღწევადობა ფასდებოდა ვერაპამილის თანაობის ან მის გარეშე.

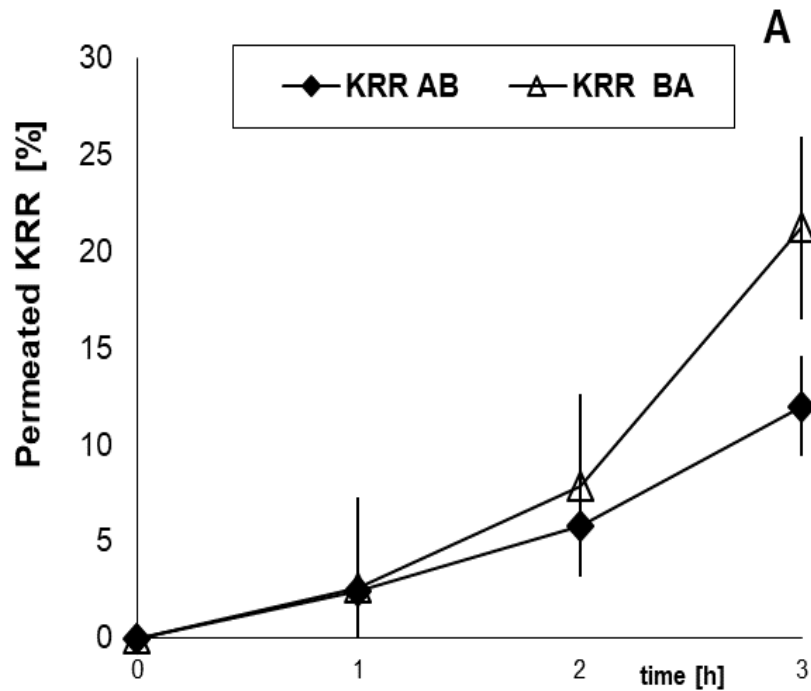
საკვლევი ნივთიერების შეღწევადობის აპარენტული კოეფიციენტის - P_{app} (cm/s) გამოთვლა ხდებოდა შემდეგი ტოლობით:

$$P_{app} = (\Delta Q / \Delta t) / (A \times C_0)$$

სადაც, $\Delta Q / \Delta t$ არის საკვლევი ნაერთის შეღწევადობის კოეფიციენტი (μ g/s), A - მონომრიანი უჯრედის ზედაპირის ფართობი (cm^2), ხოლო C_0 საკვლევი ნივთიერების საწყისი კონცენტრაცია (მკგ /მლ) დონორულ ნაწილში.

ტრანსპორტირების პროცენტულობა გამოითვლებოდა რეციპიენტ დანაყოფში შეღწეული KRR-ის რაოდენობის თანაფარდობით დონორ დანაყოფში არსებულ საწყის კონცენტრაციასთან $\times 100$. ტრანსპორტირების მონიტორინგი ხდებოდა 3 საათის განმავლობაში.

შედეგები და განხილვა: KRR-ის ტრანს-ეპითელიური ტრანსპორტირების შეფასება მოხდა ადამიანის მსხვილი ნაწლავის ადენოკარცინომის (Caco-2) უჯრედულ ხაზში. უფრო მეტიც, პროცესში P-gp-ის ჩართულობის ვერიფიკაცია ჩატარდა P-gp-ის ერთ-ერთი ტიპური მოდულატორის - ვერაპამილის დამატებით. ბოლო ხანებში დიდი ინტერესი შეიმჩნევა ნაწლავებიდან ნივთიერებების გამოდევნის მიმართ, როგორც პერორალურად მიღებული წამლების დაბალი ან ცვალებადი შეწოვის სავარაუდო მიზეზისა. ამასთან მიმართებაში, Caco-2 უჯრედები ფართოდ გამოიყენება როგორც ნაწლავის ეპითელიუმის მოდელი წამლის შესაძლო გამოდევნის პრობლემების სკრინინგისთვის. თუ Caco-2 უჯრედებში ნივთიერების შეღწევადობის უნარიანობა დაბალია მაშინ შესაძლებელია მისი დეპრიორიტიზირება როგორც დაბალი ნაწლავური შეწოვის უნარის მქონე ნაერთისა და შესაბამისად მისი აბსორბცია ადამიანის ორგანიზმშიც ნაკლები იქნება (Sambuy et al., 2005).



სურათი 2.24. საკვლევი ნაერთის შეღწევის უნარიანობა Caco-2 მონოშრიან უჯრედებში აბსორბციული და ბაზოლატერული მიმართულებით. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

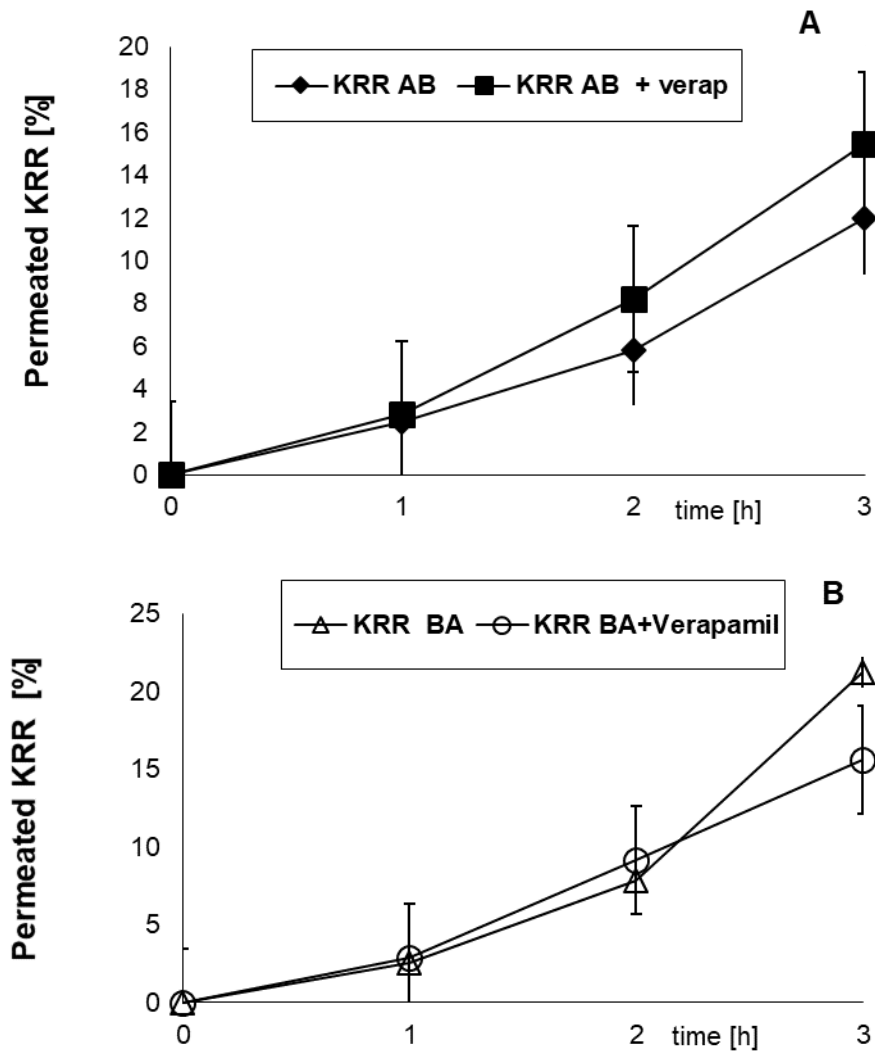
როგორც ცნობილია P-gp განლაგებულია Caco-2 უჯრედების აპიკალურ მემბრანაში და ნაწლავის ლორწოვანი (აპიკალურ) გარსის ზედაპირზე. იგი წარმოადგენს ძირითად ბარიერს პერორალურად მიღებული მრავალი სტრუქტურულად განსხვავებული წამლისათვის. სხვა მრავალ სატრანსპორტო ცილებთან შედარებით, რომლებიც ამოიცნობენ მხოლოდ სპეციფიურ ქიმიურ სუბსტრატებს, P-gp გამორჩეულია, რადგანაც ის გამოდევნის განსხვავებული სტრუქტურის მქონე მთელ რიგ ლიპოფილურ და კათიონურ ნივთიერებებს, მათ შორის ფენოლურ ნაერთებს (Kvaratskhelia 2019).

სურათი 2.24 -ზე მოცემულია მონაცემები 20 მკგ/მლ KRR-ის ტრანსეპითელურ შეწოვის შესახებ Caco-2 მონოშრიან უჯრედებში 37°C-ზე აბსორციულ (AP \rightarrow BL) და ბაზოლატერული (BL \rightarrow AP) მიმართულებებით დროსთან მიმართებაში. ვერაპამილის არარსებობის შემთხვევაში KRR-ის შეწოვის მაჩვენებელი წრფივი იყო ორივე

მიმართულებით 60 წუთამდე. ერთი საათით დაყოვნების შემდეგ ნივთიერების ტრანსპორტირების სიჩქარის მკვეთრი ზრდა შეინიშნებოდა ორივე მიმართულებით. 2 საათის შემდეგ საკვლევი ნაერთის შეწოვისა და გამოდევნის გამოხატული დაჩქარება, არ შეიძლება განპირობებული ყოფილიყო წამლის ზემოქმედებით გამოწვეული მემბრანის დაზიანებით, რომელიც თავის მხრივ გამოიწვევდა უჯრედულ გაჟონვას და წამლის შეწოვისა და გამოდევნის გაძლიერებას. გაფიკის გადახრა სწორხაზოვნობიდან მიუთითებს პოლარიზებული გამომდევნი ტუმბოს არსებობაზე.

როგორც სურათი 2.24-დან ჩანს KRR ამჟღავნებს ორმხრივი ტრანსპორტირების უნარს; მისი BL → AP დინების მაჩვენებელი უფრო მაღალი აღმოჩნდა AP → BL-თან შედარებით; საკვლევი ნაერთის საშუალო აპარენტული შეღწევადობის კოეფიციენტი (Papp) აბსორბციული მიმართულებით 2.14 ± 0.61 -ჯერ უფრო მეტი იყო ვიდრე სეკრეტორული მიმართულებით. P-gp-ის გამოდევნამ გამოიწვია ბაზოლატერული ტრანსპორტირების ზრდა აბსორციულთან შედარებით (Kvaratskhelia 2019). ის ნიმუში, რომლის შემთვევაშიც $P_{ratio}1$ -ს უთანაბრდება, მიჩნეულია როგორც P-gp იდენტიფიცირებული სუბსტრატების სტანდარტად. P-gp-ის ჩართულობა უჯრედებიდან ნივთიერებების გამოდევნის მექანიზმებში შეინიშნება იმ შემთხვევებში, როცა $P_{ratio} > 2$. მიღებული შედეგების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ისეთი სპეციფიური გამოდევნის სისტემები, როგორცაა P-gp შესაძლებელია ჩართულნი იყვნენ KRR-ის ბიოშელწევადობის პროცესში.

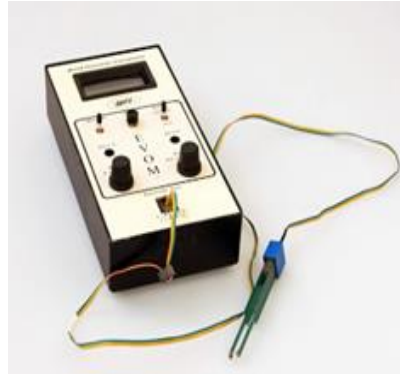
ამ პროცესში P-gp-ის ფუნქციონალური ჩართულობა შესწავლილ იქნა ვერაპამილის დამატებით, რომელიც ხშირად გამოიყენება 100 μ M კონცენტრაციით P-gp-ით გამოწვეული ტრანსპორტირების შერჩევითი ინჰიბირებისათვის (სურათი 2.25). კვლევებით დადგენილია, რომ ვერაპამილი კონკურენციას უწევს სხვა სუბსტრატებს P-gp-თან ასოცირებული ATP-აზებთან მიერთებაში (Kvaratskhelia 2019). P-gp-ის ინჰიბიტორის თანაარსებობა მნიშვნელოვნად ამცირებს KRR-ის ტრანსპორტს BL → AP მიმართულებით და ზრდის (1.6 ჯერ) AP → BL მიმართულებით, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ATP დამოკიდებული აქტიური მექანიზმები ჩართულია საკვლევი ნივთიერების ნაწლავურ აბსორბციაში.



სურათი 2.25. KRR-ის ტრანსეპითელური ტრანსპორტირება Caco-2 უჯრედებში აბსორბციული (A) და სეკრეტორული (B) მიმართულებით ვერაპამილის გარეშე და მისი თანაობისას. ტრანსპორტირების მაჩვენებლები გამოხატულია პროცენტებში უჯრედების აპიკალურ ან ბაზოლატერულ მხარეს დამატებული KRR-ის რაოდენობასთან მიმართებაში. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

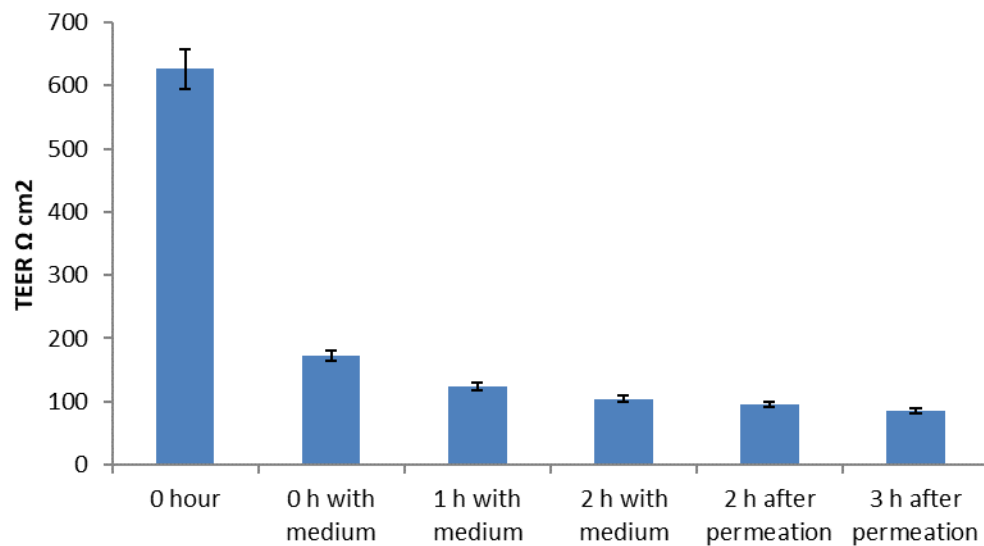
ტრანსეპითელური ელექტრული რეზისტულობა (TEER) გამოხატავს უჯრედთა ერთმრიანობის ფუნქციურ ერთიანობას და ჩამკეტი ზონის სტაბილურობას. შემცირებული ელექტრული რეზისტულობა ნაწლავური ბარიერის ფუნქციის შესუსტებაზე / დაზიანებაზე მიანიშნებს (Chen et al., 2015). საკვლევი ობიექტის და

ასევე სხვადასხვა საკვები არის შექცევადი ეფექტის შესწავლა ნაწლავის ბარიერულ თვისებებზე და ჩამკეტი ზონის გამლაზე მოხდა Caco-2 უჯრედების TEER -ის გაზომვით ხელსაწყო EVOM® -ის (World Precision Instruments Inc.) საშუალებით (სურათი 2.26).



სურათი 2.26. TEER -ის გამზომი ხელსაწყო

შედეგები წარმოდგენილია პროცენტებში, საწყის მნიშვნელობასთან მიმართებაში როცა $t = 0$, სურათი 2.25.



სურათი 2.27. Caco-2 უჯრედების TEER საკვებ და ტრანსპორტირების არეებში. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

როგორც სურათი 2.27-დან ჩანს, რომ შეინიშნება TEER -ის მაჩვენებლის ვარდნა უჯრედების მოთავსებისას სატრანსპორტო არეში და ნიმუშების აპლიკაციისას. TEER მაჩვენებლის შემცირება ბარიერის დაზიანებაზე მიუთითებს, რაც ამცირებს ეპითელიუმის უნარს ხელი შეუშალოს მოლეკულების უკონტროლო გატარებას. ეპითელური ბარიერული ფუნქციის დაკარგვა უჯრედული პოლარიზებისა და დიფერენციაციის დაკარგვის პარალელური პროცესია, თუმცა უჯრედების დაზიანება შეუქცევადი არ ყოფილა და ექსპერიმენტის დამთავრების შემდეგ, მათი გარეცხვისა და კულტივირების არეში მოთავსებისას ხდებოდა მათი რე-დიფერენციაციის უნარის აღდგენა 24 სათში.

შედეგები:

1. შესწავლილ იქნა KRR-ის ბიომელწევადობის უნარი Caco-2 უჯრედებში.
2. მიღებულმა შედეგებმა დაადასტურა, რომ საკვლევი ნივთიერებისთვის დამახასიათებელია ტიპური P-gp განპირობებული ტრანსპორტირების თვისებები, მათ შორის პრეფერენციული ტრანსპორტი ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით.
3. საკვლევი ნაერთის საშუალო აპარენტული მელწევადობის კოეფიციენტი (Papp) აბსორბციული მიმართულებით 2.14 ± 0.61 -ჯერ უფრო მეტი იყო ვიდრე სეკრეტორული მიმართულებით.
4. P-gp-ის ინჰიბიტორის - ვერაპამილის თანაარსებობა მნიშვნელოვნად ამცირებს KRR-ის ტრანსპორტს BL \rightarrow AP მიმართულებით და 1.6 ჯერ ზრდის ბაზოლატარულ ტრანსპორტს.
5. KRR-ს ტრანსპორტირებაში P-gp-ის ჩართულობის გამო შემდგომი კვლევები მიმართული იქნება ისეთი ნივთიერებების სკრინინგზე, რომლებიც წარმოადგენენ P-gp-ის ATP-აქტიურობის ინჰიბირების მნიშვნელოვან საშუალებებს და გააუმჯობესებენ საკვლევი ნაერთის შეწოვას ნაწლავურ გარემოში.

2.5 ბიოფლავონოიდის შელწევადობის გაუმჯობესება ბიოდეგრადირებადი პოლიმერების გამოყენებით

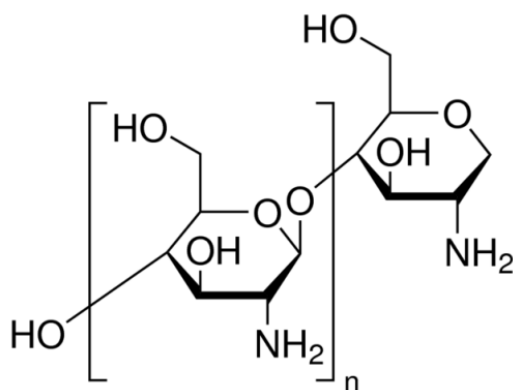
მრავალი კვლევის შედეგად დადასტურდა, რომ ზოგიერთ პოლიმერს აქვს უნარი გავლენა მოახდინოს წამლის შეწოვაზე ნაწლავური P-გლიკოპროტეინების (P-gp) ინჰიბირებით. ორგანიზმში წამლის მუკოადჰეზიური მიწოდება ზრდის ნივთიერების აბსორბციას და ბიოშეღწევადობას, რაც განპირობებულია ლორწოვანი გარსის ზედაპირის მნიშვნელოვანი ფართობით და სისხლის მაღალი ნაკადით (Slütter et al., 2009). ასეთი სისტემების შემუშავებაში პოლიმერები ასრულებენ ისეთ მნიშვნელოვან როლს, როგორცაა აქტიური ნივთიერების კონტაქტის დროის გახანგრძლივება სამიზნე ორგანოში (Ensign et al., 2012).

კვლევის შემდგომი მიზანი იყო შეგვესწავლა სხვადასხვა პოლიმერის გავლენა ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის კემფეროლ 3-რობინოზიდ 7- რამნოზიდის (KRR) ნაწლავურ შეწოვაზე. წინა ექსპერიმენტებიდან, რომელიც ჩატარდა Caco-2 უჯრედული ხაზების გამოყენებით დადგინდა, რომ P-gp, რომელიც ლოკალიზებულია ნაწლავის ეპითელურ უჯრედებში შეიძლება პასუხისმგებელი იყოს უჯრედიდან KRR-ის გაძლიერებულ გამოდევნასა და დაბალ აბსორბციაზე.

იმისათვის რომ შეგვესწავლა მუკოადჰეზიური პოლიმერების გავლენა KRR-ის ნაწლავურ აბსორბციაზე, კვლევებში გამოყენებულ იქნა ადამიანის კოლინჯის ადენოკარცინომის უჯრედული ხაზი (Caco-2), როგორც ნაწლავური ბარიერის მოდელი (Sambuy et al., 2005).

საკვლევი სუბსტანციის ტექნოლოგიური და ბიოფარმაცევტული მახასიათებლების გათვალისწინებით შერჩეულ იქნა შემდეგი პოლიმერები:

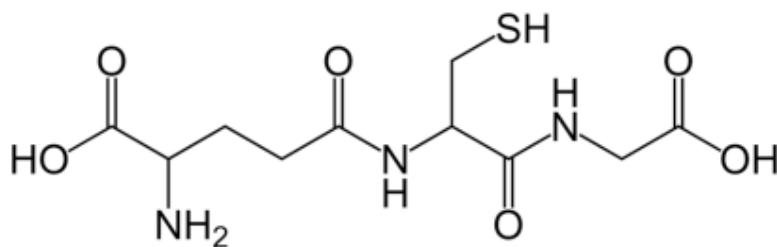
ხიტოზანი (CH) Deacetylated chitin, Poly(D-glucosamine) CAS N: 9012-76-4-საშუალო მოლეკულური მასის - არატოქსიური, ბიოშეთავსებადი, ბიოდეგრადირებადი პოლიმერია, ზრდის ნივთიერებების ბიოშეღწევადობას, აღნიშნული თვისებების გამო იგი აქტიურად გამოიყენება ფარმაცევტულ ტექნოლოგიაში წამლის მიწოდების სხვადასხვა სისტემების შემუშავებისთვის (სურათი 2.28).



სურათი 2.28. ხიტოზანი

უფრო მეტიც, შედარებით ადვილია პოლიმერის ძირითად ჯაჭვზე სასურველი ფუნქციური ჯგუფების ინკორპორაცია (Kumar et al., 2016; Laffleur et al., 2012). ხიტოზანიდან წარმოებული ნაერთები რომელთაც აქვთ ზედაპირზე თიოლების (-SH) ჯგუფი, ხასიათდებიან ისეთი მნიშვნელოვანი თვისებებით როგორცაა გამომდევნი ტუმბოების ინჰიბირების ძლიერი უნარი, ბიომედწვეადობის, მუკოადაპტიურობის ზრდა და ა.შ. (Ways et al., 2018). მრავალი კვლევის მიერ იქნა დადასტურებული გლუტათიონის გამოყენება ხიტოზან-გლუტათიონის (CH -GSH) კონიუგატების სინთეზისთვის (Li et al., 2011).

L-გლუტათიონი აღდგენილი (GSH) γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine, CAS N: 70-18-8; MW: 307.32 (სურათი 2.29).

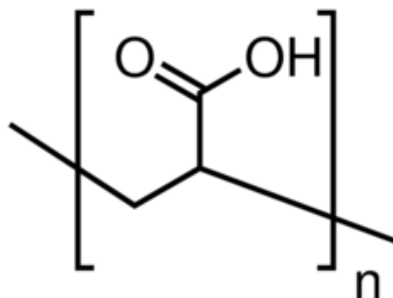


სურათი 2.29. L-გლუტათიონი აღდგენილი (GSH)

GSH მცირე ზომის ტრიპეპტიდია, ტოქსიკოლოგიური თვალსაზრისით უსაფრთხოა, ხელს უწყობს უჯრედზე ადაპტიურობას და შესაფერისი ნივთიერებაა ბიოსამედიცინო გამოყენებისათვის. CH-ის კომბინაციამ აღდგენილ GSH-თან

გამოავლინა შეღწევადობის გაზრდის უფრო მაღალი ეფექტი CH-თან შედარებით (Talaie et al., 2011).

პოლიაკრილის მჟავა (PAA) - CAS N 9003-01-4; MW: 1800 (სურათი 2.30)



სურათი 2.30. პოლიაკრილის მჟავა (PAA)

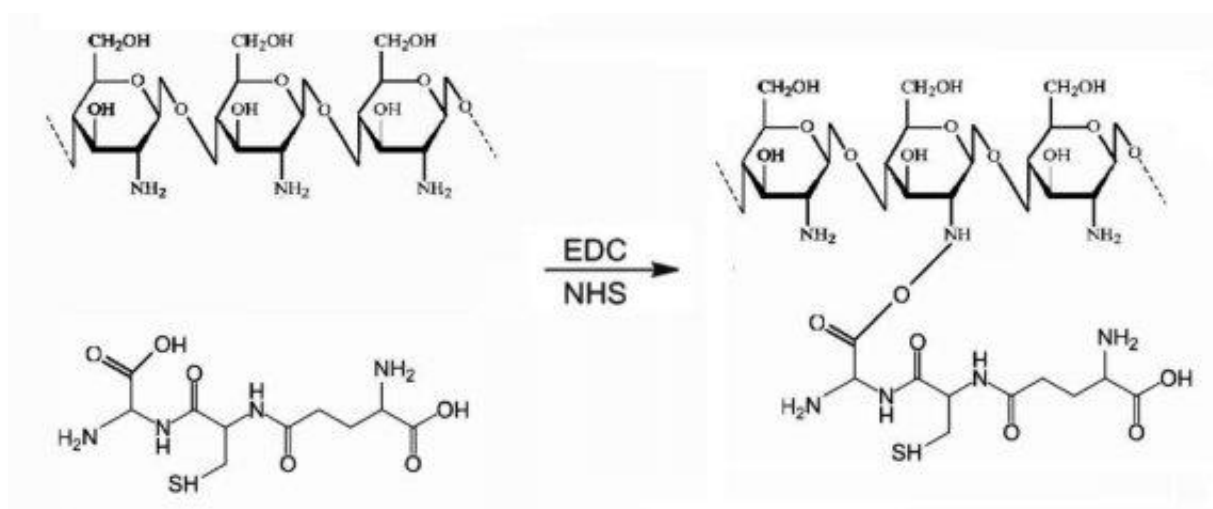
PAA სინთეზური, ანიონური, არა ტოქსიკური პოლიმერია, რომელიც ფართოდ გამოიყენება მუკოადაპტიური წამლის მიწოდების სისტემების სინთეზში. იგი ცნობილი და კარგად შესწავლილი პოლიმერია. GSH-ის კოვალენტური შეკავშირება PAA-სთან ქმნის ისეთ კონიუგატებს, რომლებიც ავლენენ გაუმჯობესებულ მუკოადაპტიურ თვისებებს არამოდიფიცირებულ PAA-სა და სხვა გენერირებულ თიოლირებულ PAA წარმოებულებთან შედარებით (Duggan et al., 2016; Kafedjiiski et., 2015).

ხიტოზან-გლუტათიონის კონიუგატების სინთეზი

GSH-ის კოვალენტური მიერთება ქიტოზანთან მიღწეულ იქნა ამიდური ბმების ფორმირებით GSH-ის კარბოქსილის მჟავის ჯგუფსა და ხიტოზანის ამინურ ჯგუფებს შორის (სქემა 2.5).

საწყის ეტაპზე მოხდა 1 გ ხიტოზანის ჰიდრატაცია 1 M მარილმჟავას 8 მლ ხსნარში და დაემატა დემინერალიზებული წყალი 1%-იანი (w/v) პოლიმერული ხსნარის მისაღებად. pH დონე დარეგულირებულ იქნა 6.0 -მდე 5 M NaOH-ის დამატებით. შემდეგ, მუდმივი მორევის ქვეშ დაემატა 5გ GSH, რომელიც გახსნილი იყო 10 მლ დემინერალიზებულ წყალში. მიღებულ ნარევს დაემატა 5მლ დემინერალიზებულ წყალში წინასწარ გახსნილი EDAC 200 mM- საბოლოო

კონცენტრაციის მიღებამდე. ამის შემდეგ სარეაქციო ხსნარს დაემატა 5მლ დემინერალიზებულ წყალში გახსნილი 200 mM NHS ძლიერი მორევის პირობებში. pH - ის ნიშნული შეცვლილი იქნა 6.0-მდე 5 M NaOH-ის საშუალებით. სარეაქციო ხსნარი მოთავსებული იყო 7 საათის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე მუდმივი მორევის ქვეშ. მიღებული პოლიმერული კონიუგატის დიალიზირება მოხდა მილაკებში (მოლეკულური წონის ერთეულით 12 kDa) თავიდან 5 mM HCl-ის არსებობისას, ორჯერ 5 mM HCl არსებობისას, რომელიც 1% NaCl-ს შეიცავდა და ბოლოს ორჯერ 1 mM HCl არსებობისას. შემდეგ გაყინული პოლიმერული წყალხსნარები (ნიმუშები, საკონტროლო ნაერთები და კომპლექსები) ლიოფილიზირებულ იქნა -50°C-ზე 0.01 mbar (Lyolab B; Inula, Austria) წნევის ქვეშ და შეინახა 4°C ტემპერატურაზე შემდგომი გამოყენების მიზნით (Kafedjiiski, 2005).

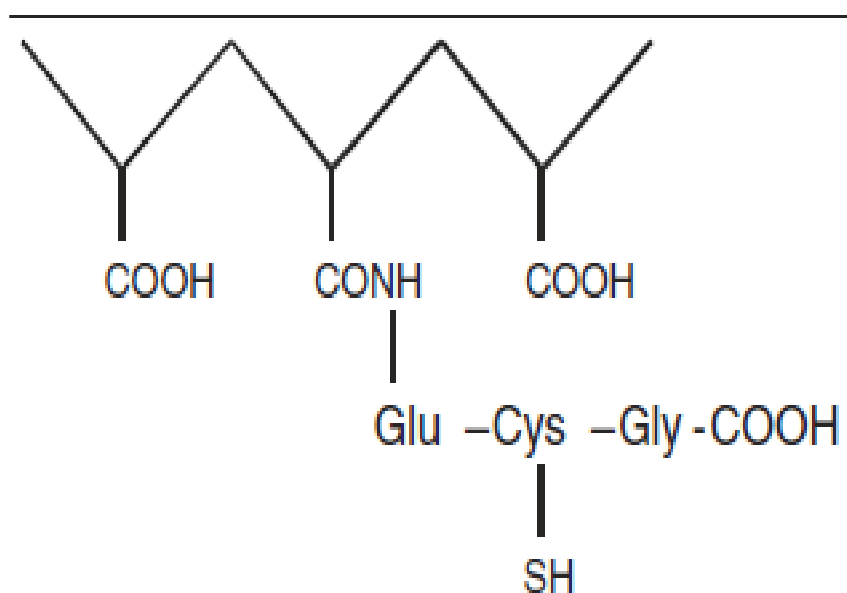


სქემა 2.5. ხიტოზან-გლუტათონის კონიუგატების სინთეზი

პოლი (აკრილის მჟავის) PAA - გლუტათონის სინთეზი

აღდგენილი გლუტათონი კოვალენტურად იქნა მიერთებული პოლი-აკრილის მჟავასთან ამიდური ბმების წარმოქმნის გზით გლუტათონის ამინურ ჯგუფსა და პოლიმერის კარბოქსილის ჯგუფს შორის (სურათი 2.31). საწყის ეტაპზე, მოხდა 1გ PAA -ს ჰიდრატაცია 80მლ დემინერალიზებულ წყალში და მიღებული პოლიმერული

ხსნარის pH მაჩვენებლის დარეგულირება 5.5-მდე 5M NaOH-ის დამატებით. პოლი-აკრილის მჟავის კარბოქსილის ჯგუფის ბმის გააქტივების მიზნით ნარევეს დაემატა 5მლ დემინერალიზებულ წყალში გახსნილი EDAC 50 mM საბოლოო კონცენტრაციის მიღებამდე. მუდმივი მორევის ქვეშ ოთახის ტემპერატურაზე 15 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ ხსნარს დაემატა 10მლ დემინერალიზებულ წყალში გახსნილი 2 გ აღდგენილი გლუტათიონი და pH კორექტირება მოხდა 5.5-მდე. სარეაქციო ნარევი 3 საათით დაყოვნდა ოთახის ტემპერატურაზე შერევის შეუწყვეტლად. მიღებული PAA-GSH კონიუგატის გამოყოფა მოხდა დიალიზის მეთოდით პირველად 1 mM HCl-ის თანაობისას, ორჯერ 1 mM HCl -ის, რომელიც დამატებით შეიცავდა 1% NaCl და ბოლოს ორჯერ 1 mM HCl-ის თანაობისას. საკონტროლო ნიმუშების მომზადება და გამოყოფა ჩატარდა იმავე გზით როგორც პოლიმერის კონიუგატების, მხოლოდ EDAC დამატების გარეშე შეკავშირების რეაქციაში. დიალიზის შემდეგ, პოლიმერების და შესაბამისი საკონტროლო ხსნარების pH მაჩვენებლები ხელახლა დარეგულირდა 4-მდე და გაყინული პოლიმერული წყალხსნარების ლიოფილიზაცია მოხდა -50°C-ზე, 0.01 mbar წნევის ქვეშ (Lyolab B; Inula, Austria) და შენახულ იქნა 4°C-ზე შემდგომი გამოყენების მიზნით (Talaie et al., 2011).



სურათი 2.31. პოლი-აკრილის მჟავა - გლუტათიონის კონიუგატის (PAA-GSH) ქიმიური ქვესტრუქტურა

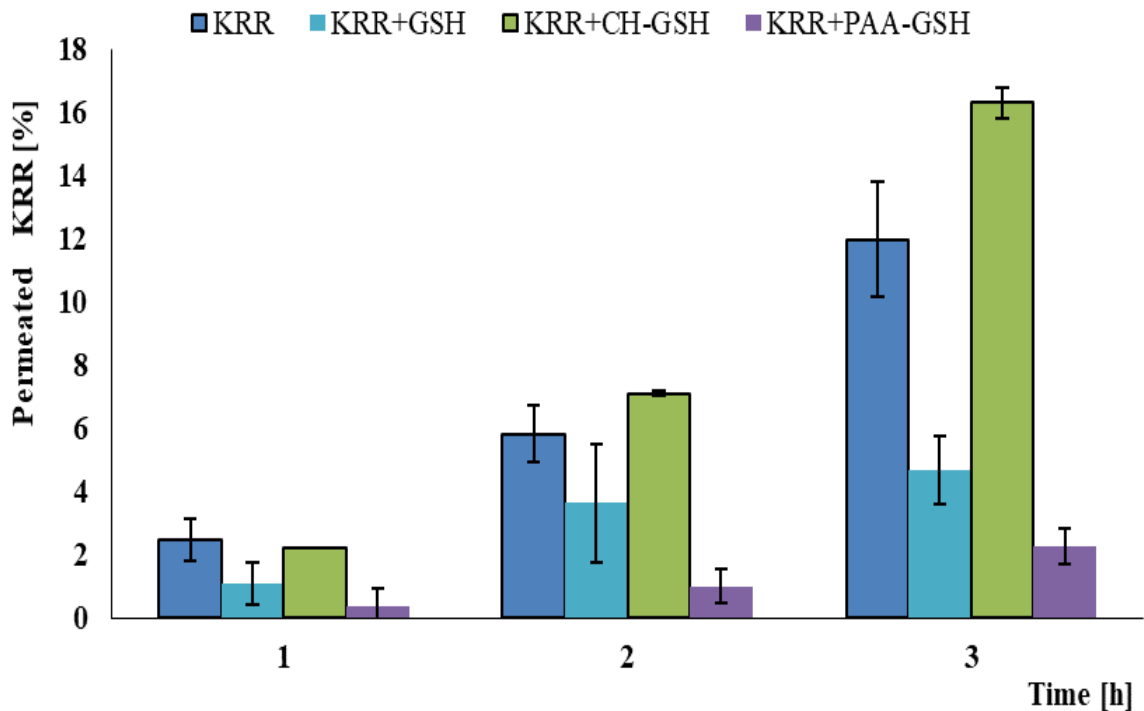
ბიომელწევადობის შესწავლა მოხდა Caco-2 მონოშრიან უჯრედებზე, რომელთა კულტივირება ხდებოდა 24 დღის განმავლობაში. ექსპერიმენტი ჩატარდა იმავე პირობებში როგორც აღწერილია თავი 2.4ში, კერძოდ ცდებში გამოიყენებოდა 500 - 600 Ω cm² TEER-ის მქონე უჯრედები. ყველა ექსპერიმენტის დაწყებამდე Caco-2 უჯრედები ირეცხებოდა მარილ-შემცველი ფოსფატური ბუფერით (pH 6.8). ორმხრივი ტრანსპორტირების ექსპერიმენტი, ე.ი. აპიკალური ნაწილიდან \rightarrow ბაზოლალატერულის (AP \rightarrow BL) და ბაზოლალატერულიდან \rightarrow აპიკალურ (BL \rightarrow AP) მხარეს, ჩატარდა მინიმუმ სამჯერ; საკვლევი ობიექტის კონცენტრაცია იყო 20 მკგ/მლ.

ტრანსპორტირების ექსპერიმენტის მსვლელობისას საკნის ორივე მხარეს MEM-ის ჩანაცვლება მოხდა HEPES ბუფერით (pH 6.8). შემდეგ HEPES -ის ჩანაცვლება ხდებოდა იმავე ბუფერში მომზადებული GSH, CH-GSH ან PAA-GSH და საკვლევი ნივთიერების ხსნარებით. TEER იზომებოდა საათში ერთხელ; აქცეპტორის მხრიდან ნიმუშების აღება 50 მკლ ოდენობით და სატრანსპორტო არით ჩანაცვლება ასევე ხდებოდა საათობრივად.

კვლევის დასრულებისას, სატრანსპორტო არე ფრთხილად ცილდებოდა, Caco-2 უჯრედები ირეცხებოდა მარილშემცველი ფოსფატური ბუფერით (pH 6.8) და ემატებოდა საკულტივაციო არე. Caco-2 უჯრედები ყოვანდებოდა CO₂ ინკუბატორში 24 საათით შემდგომი რეგენერაციისათვის.

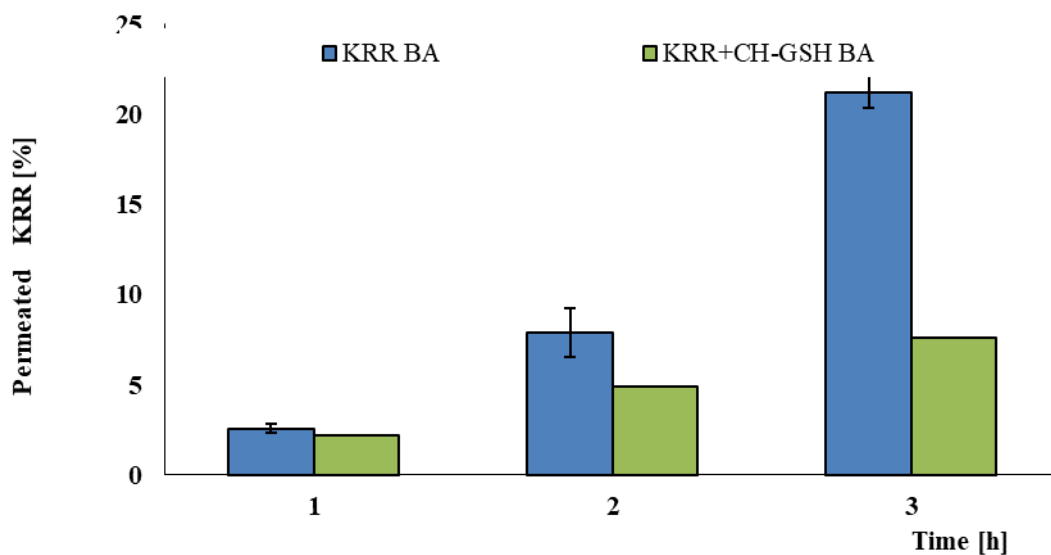
საკვლევი ნიმუშების ცენტრიფუგირება ხდებოდა 15000გ სიჩქარეზე 5 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე; 50 მკლ ნალექზედა სითხის ანალიზი ჩატარდა HPLC მეთოდით. აბსორბირებული საკვლევი ნაერთის რაოდენობრივი განსაზღვრა მოხდა წინა პარაგრაფში უკვე აღწერილი მეთოდის მიხედვით.

შედეგები და განხილვა: KRR-ის აბსორბციის ხარისხზე GSH-ს, CH-GSH-სა და PAA- GSH-ს გავლენის შესწავლა მოხდა *in vitro* მეთოდით, რისთვისაც გამოყენებულ იქნა ადამიანის კოლინჯის ადენოკარცინომას (Caco-2) უჯრედული ხაზი. სურათი 2.32 - ზე წარმოდგენილია KRR-ის ტრანსეპითელური ტრანსპორტი აბსორბციული მიმართულებით (აპიკალურიდან ბაზოლალატერულისაკენ; AP \rightarrow BL) Caco-2 ერთშრიან უჯრედებში სხვადასხვა პოლიმერების თანაობისას 37°C-ზე დროსთან მიმართებაში.



სურათი 2.32. პოლიმერების გავლენა KRR-ის აბსორბციულ ტრანსპორტზე Caco-2 ერთშრიან უჯრედებში. ტრანსპორტირების მაჩვენებლები გამოხატულია პროცენტებში უჯრედების აპიკალურ მხარეს დამატებული KRR-ის რაოდენობასთან მიმართებაში. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

როგორც სურათი 2.32-დან ჩანს, გამოყენებული პოლიმერები - გლუტათიონი და პოლიაკრილის მჟავის კონიუგატი გლუტათიონთან - მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენენ KRR-ის გადატანის ეფექტურობაზე აპიკალურიდან ბაზოლალატერული მიმართულებით ცალკე საკვლევი ნივთიერების ტრანსპორტირებასთან შედარებით. გლუტათიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანი ავლენდა KRR-ის შეღწევადობის გაუმჯობესების მაღალ ეფექტს თავისუფალ ბიოფლაგონოიდთან შედარებით - KRR-ის ტრანსპორტირების უნარი აღნიშნული პოლიმერის თანაობისას გაიზარდა 1.36-ჯერ.

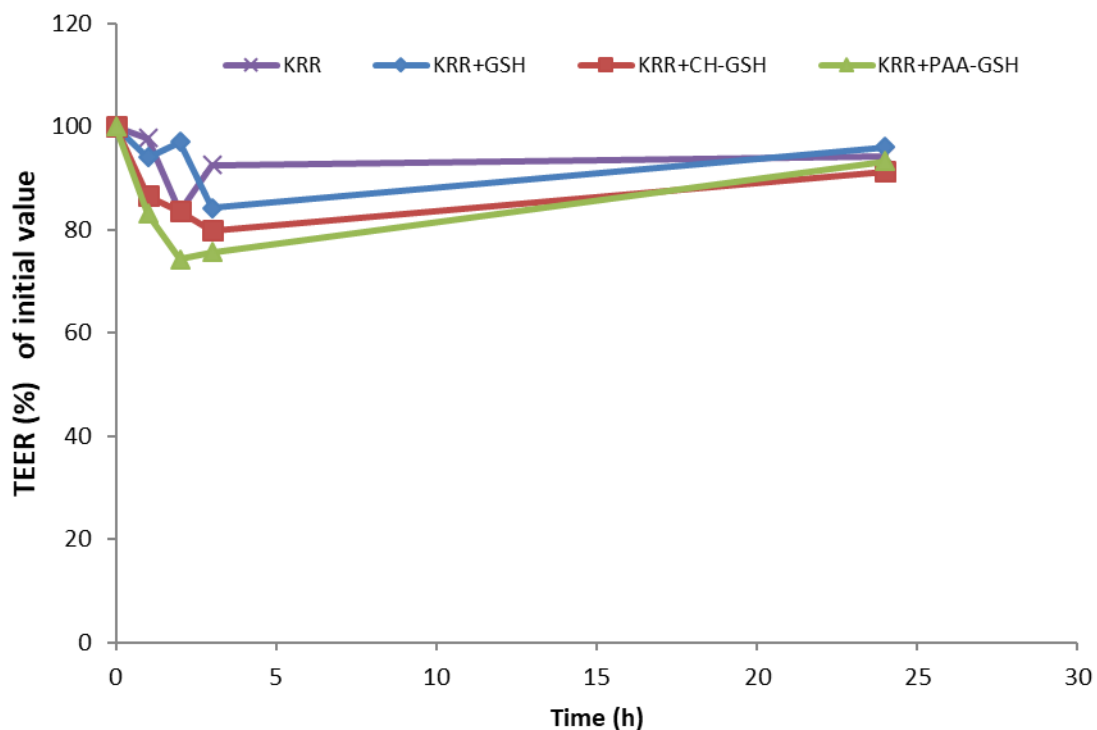


სურათი 2.33 CH-GSH პოლიმერის გავლენა KRR-ის ბაზოლატერულ ტრანსპორტზე Caco-2 ერთშრიან უჯრედებში. ტრანსპორტირების მაჩვენებლები გამოხატულია პროცენტებში უჯრედების აპიკალურ მხარეს დამატებული KRR-ის რაოდენობასთან მიმართებაში. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

ასევე შესწავლილი იქნა საკვლევი ნაერთის ბაზოლატერულ ტრანსპორტირებაზე მოდიფიცირებული ხიტოზანის გავლენა. როგორც სურათი 2.33-დან ჩანს CH-GSH-ს კომბინაციაში KRR-ის გამოდევნა ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით მნიშვნელოვნად უფრო სუსტია ვიდრე სუფთა KRR-ის; საკვლევი ობიექტის შეღწევადობის საშუალო აპარენტული კოეფიციენტი (Papp) აბსორბციული მიმართულებით 2.79 ± 0.91 - ჯერ უფრო დაბალი იყო გლუტატიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანის თანაობისას ვიდრე სუფთა KRR-ის შემთხვევაში. მიღებული შედეგები საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ხიტოზან-გლუტატიონის კონიუგატს შეუძლიათ გააუმჯობესოს საკვლევი ფლავონოიდის ტრანსპორტირება ერთშრიანი Caco-2 უჯრედებში.

ცალკე საკვლევი ობიექტის და ასევე სხვადასხვა პოლიმერებთან მისი კომბინაციების შექცევადი ეფექტის შესწავლა ნაწლავის ბარიერულ თვისებებზე და ჩამკეტი ზონის გაშლაზე მოხდა Caco-2 უჯრედების TEER -ის გაზომვით. შედეგები

წარმოდგენილია პროცენტებში, საწყის მნიშვნელობასთან მიმართებაში როცა $t = 0$, სურათი 2.34.



სურათი 2.34. KRR, KRR+GSH, KRR+CH-GSH და KRR+PAA-GSH-ის გავლენა Caco-2 უჯრედების TEER რეზისტულობაზე ექსპერიმენტის მსვლელობისას და მის დამთავრებისას უჯრედის გარეცხვისა და საკულტივაციო არის დამატებიდან 24 საათის შემდეგ. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

როგორც სურათი 2.34-დან ჩანს შეინიშნება TEER -ის მაჩვენებლის ვარდნა ნიმუშების აპიკალურ მხარეს აპლიკაციისას. TEER მაჩვენებლის შემცირება ბარიერის დაზიანებაზე მიუთითებს, რაც ამცირებს ეპითელიუმის უნარს ხელი შეუშალოს მოლეკულების უკონტროლო გატარებას. KRR-ის კომბინაციამ პოლიაკრილის მჟავა-გლუტათიონის კონიუგატთან უფრო მეტად შეამცირა TEER მაჩვენებელი ვიდრე ეს მოხდა გლუტათიონით მოდიფიცირებულ ხიტოზანის ან გლუტათიონის შემთხვევაში. სამი საათის შემდეგ ჩამკეტი ზონის გახსნის დონე KRR+PAA-GSH-ისთვის იყო

დაახლოებით 76%, KRR+CH-GSH-სთვის 80% და KRR+ GSH-სთვის 84%, TEER საწყის მაჩვენებელთან შედარებით, ხოლო ცალკე KRR-ის შემთხვევაში 93%-ის ტოლი იყო.

უნდა აღინიშნოს, რომ TEER -ის დროზე დამოკიდებულ შემცირებას, რაც განპირობებული იყო KRR-ის კომბინირებით CH-GSH-სთან, მოჰყვა KRR-ს ტრანსპორტირების გაზრდა, რაც მიუთითებს უჯრედშორისი ზმების შესუსტებაზე, ე.ი. გაიხსნა უჯრედშორისი გზები ჩვეულებრივ დაბალი ბიომედწევადობის ნაერთებისათვის ეპითელიუმის გავლით. ეპითელიური ბარიერული ფუნქციის დაკარგვა უჯრედული პოლარიზებისა და დიფერენციაციის დაკარგვის პარალელური პროცესია, თუმცა უჯრედების დაზიანება შეუქცევადად არ ხდება და მათ რე-დიფერენციაციის უნარი აღუდგებათ 24 სათში.

მუკოაღჭეხიური სისტემების მომზადება

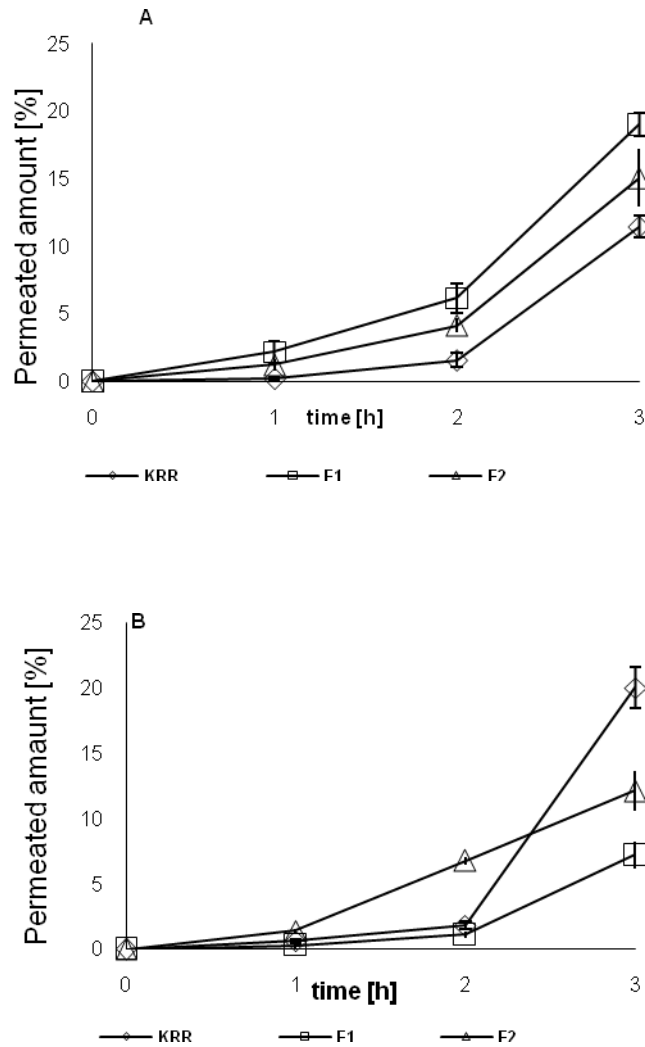
კვლევის შემდგომ ეტაპს წარმოადგენდა შერჩეული პოლიმერით KRR მუკოაღჭეხიური ტაბლეტების მომზადება და მათი ბიომედწევადობის შედარება საკონტროლო ტაბლეტებთან საკვლევი ნივთიერებით.

ამ მიზნით ჩვენს მიერ გამოკვლეულ იქნა KRR მუკოაღჭეხიური სისტემის ორი ნიმუში: F 1 და F 2. F 1 -ში აქტიური ნივთიერება იყო გახსნილი მინიმალური ოდენობის დიმეთილსულფოქსიდში, ხოლო F 2 -ში - გახსნილი იყო მინიმალური ოდენობის ეთანოლში.

მომზადებული მუკოაღჭეხიური ტაბლეტები შედგებოდა მუკოაღჭეხიური მატრიცისაგან (20 მგ), რომელშიც დისპერგირებული იყო KRR (25%); ლიოფილიზირებული CH-GSH (70%) და GSH (5%) და გამყოფი შრისგან - გრანულატი (ტაბლეტის მასის 42%); ტაბლეტების დაწნეხვა მოხდა 8 kN წნევის ქვეშ; მიიღებოდა 5მმ დიამეტრის და 1მმ სიმაღლის ტაბლეტები. ყველა ტაბლეტის შემოგარსვა ხდებოდა ნაწლავში ხსნადი გარსით Eudragit L 100-ით(Germany).

ბიომედწევადობის შესწავლა ჩატარდა Caco-2 მონოშრიან უჯრედებზე ზემოთ აღწერილი მეთოდის მიხედვით. აპიკალურ და ბაზოლატერულ მხარეს აბსორბციული და ბაზოლატერული ტრანსპორტისთვის შესაბამისად ემატებოდა KRR-ის ან

მუკოადჰეზიური სისტემის ბუფერული ხსნარები, რომლებიც ასევე შეიცავდნენ თავისუფალ GSH. შედეგები ასახულია სურთზე 2.35.



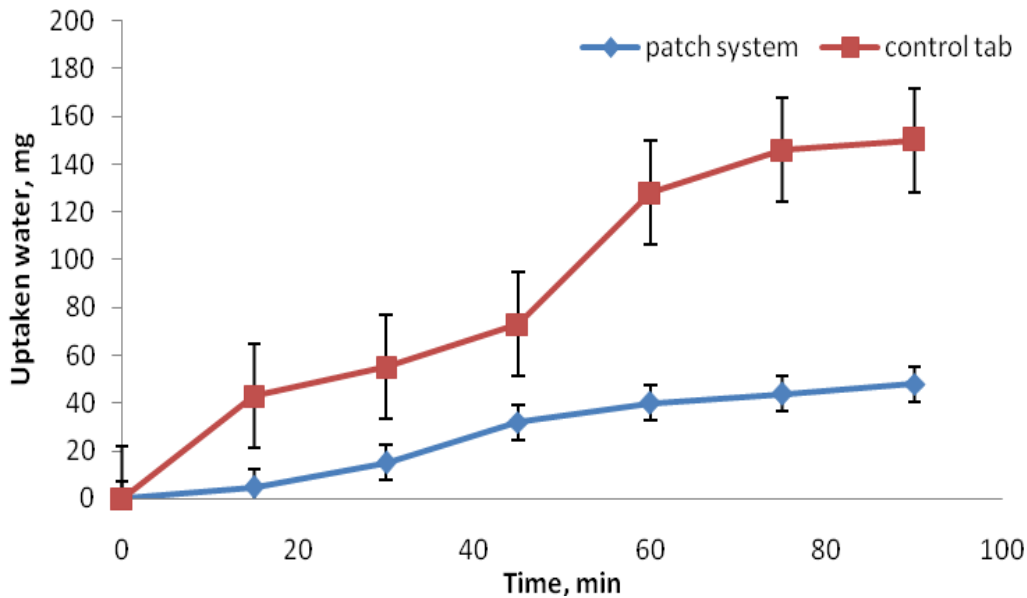
სურათი 2.35. მუკოადჰეზიური სისტემების (F1, F2) და KRR-ის ტრანსეპითელური ტრანსპორტირება Caco-2 უჯრედებში აბსორბციული (A) და სეკრეტორული (B) მიმართულებით თავისუფალ GSH-ის თანაობისას. ტრანსპორტირების მაჩვენებლები გამოხატულია პროცენტებში უჯრედების აპიკალურ ან ბაზოლატერულ მხარეს დამატებული KRR-ის რაოდენობასთან მიმართებაში. თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

მიღებული შედეგების მიხედვით Ch-GSH კომბინაციამ F1 და F2 ფორმულაციაში თავისუფალ GSH-ის თანაობისას შესაბამისად 1.66 და 1.32 -ჯერ გაზარდა KRR-ის ტრანსპორტირება აპიკალური და დაახლოებით 2.78 და 1.65 ჯერ შეამცირა აბსორბციული მიმართულებით ცალკე აღებულ საკვლევ ნივთიერებასთან შედარებით. მემბრანის მთლიანობის კონტროლის მიზნით Caco-2 უჯრედების TEER იზომებოდა მთელი ექსპერიმენტის პერიოდში და მისი დასრულების შემდეგაც. კვლევის დამთავრებიდან 4-5 საათის შემდეგ TEER თითქმის მთლიანად აღდგა, ხოლო 24 საათის შემდეგ ყველა უჯრედისთვის იყო სრულიად აღდგენილი. ექსპერიმენტის მონაცემები კორელაციაშია Caco-2 უჯრედებში ჩატარებულ ბიომელწევადობის კვლევის მონაცემებთან. მიღებული შედეგების მიხედვით F1 ფორმულაცია იქნა შერჩეული და შემდგომი კვლევები გაგძელდა აღნიშნულ ნიმუშებზე.

მუკოადჰეზიურობა პირდაპირ ასოცირდება გაჯირჯვების უნართან. მუკოადჰეზიური პოლიმერების გაჯირჯვების მახასიათებლები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ ადჰეზიურ თვისებებსა და კოგეზიურობის უნარზე (Roldo et al., 2004). ჩვენი კვლევის შემდგომ მიზანს წარმოადგენდა სისტემის გაჯირჯვების უნარის შესწავლა.

წყლის შეწოვის უნარი განისაზღვრა გრავიმეტრული მეთოდით. ტაბლეტების ინკუბირება ხდებოდა 0.1 M ფოსფორმჟავას ბუფერულ ხსნარში (pH 6.8) 37°C. განსაზღვრული დროის ინტერვალებში ხდებოდა ტაბლეტების ამოღება საინკუბაციო არედან და შეწოვილი წყლის რაოდენობის გაზომვა გრავიმეტრულად. შედეგები მოცემულია სურათ 2.36-ზე.

როგორც სურათიდან ჩანს, მუკოადჰეზიურ სისტემები ხასიათდებიან გაჯირჯვების უფრო დაბალი ხარისხით შემოუგარსავ ტაბლეტებთან შედარებით. Ch-GSH-ის შემცველი ტაბლეტების მასა 90 წუთის შემდეგ გაიზარდა დაახლოებით 137.14%-ით, ხოლო შემოუგარსავი, მარტო საკვლევ ნივთიერების შემცველი ტაბლეტების მასა კი 428.57%-ით. ექსპერიმენტის ბოლოს, არ დაფიქსირებულა ტაბლეტების ეროზია ან დაშლა. ნელი გაჯირჯვების პროცესი ხელს უწყობს კონიუგატის მაღალ კოჰეზიურ თვისებებს.



სურათი 2.36. საკონტროლო ტაბლეტების და ადჰეზიური სისტემების გაჯირჯევის უნარი 0.1 M ფოსფორმჟავას ბუფერულ ხსნარში (pH 6.8). თითოეული მონაცემი მინიმუმ სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელია \pm SD.

მუკოადჰეზიური სისტემიდან (F1 ფორმულაცია) KRR-ის გამოთავისუფლების სიჩქარე შეისწავლებოდა *in vitro* მეთოდით (USP მიხედვით). საკვლევი ნიმუში გადატანილ იქნა 10 მლ 0.1 M HCl -ის (pH 1) შემცველ ქიმიურ ჭიქაში, რომელიც თავდახურულ მდგომარეობაში და მუდმივი შერევის პირობებში თავსდება წყლის აბაზანაში 37°C-ზე. ყოველ ნახევარ საათში ხდებოდა 0,2 მლ ოდენობის ხსნარის ამოღება და იმავე რაოდენობის 37°C - იანი მარილმჟავის ხსნარით ჩანაცვლება. მარილმჟავის ხსნარში 2 საათიანი ექსპოზიციის შემდეგ კვლევა გაგებოდა 10 მლ ფოსფატურ ბუფერში (pH 6.8); PH -ის რეგულირება ხდებოდა 2,5 მლ 0.2 M სამფუძიანი ნატრიუმის ფოსფატის ხსნარით. ეს პირობები მთელი კვლევის განმავლობაში იყო შენარჩუნებული. სისტემიდან ხსნარში გადასული საკვლევი ობიექტის რაოდენობა განისაზღვრა მესამე თავში აღწერილი HPLC მეთოდის მიხედვით.

მიღებული შედეგების მიხედვით KRR -ის გამოთავისუფლება ხდებოდა დაახლოებით 8 საათის განმავლობაში. პირველი 2 საათის განმავლობაში აქტიური ნივთიერების გამოთავისუფლება არ დაფიქსირებულა. PH -ის ცვლილებიდან 6 საათის შემდეგ გამოთავისუფლდა $59.78 \pm 0.82\%$, რაც შეიძლება აიხსნას სისტემის კონსტრუქციით, რომელიც სავარაუდოდ გამოთავისუფლების 2 მექანიზმით ხასიათდება: კონტროლირებადი დიფუზიით და გაჯირჯვებით. აქედან გამომდინარე შეიძლება, ვივარაუდოთ, რომ ორგანიზმში წამლის მიწოდების მუკოადჰეზიური სისტემა მიზანშეწონილია KRR -ის ეფექტური აბსორბციისთვის და მომავალში გაგძელდება სამუშაოები ამ მიმართულებით.

შედეგები:

1. შესწავლილ იქნა ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის შელწევადობაზე მუკოადჰეზიურ წამლის ფორმებში გამოყენებული ბიოდეგადირებადი პოლიმერების გავლენა მოხდა Caco-2 მონოშრიან უჯრედებზე.

2. ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ აბსორბციული ტრანსპორტირება ხიტოზან-გლუტატიონის კონიუგატების არსებობისას 1.36-ჯერ გაუმჯობესდა ხოლო ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით გამოდევნა 2.79 ± 0.91 -ჯერ შემცირდა. გლუტატიონი და პოლიაკრილის მჟავა-გლუტატიონის კონიუგატი არანაირ მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენდნენ საკვლევი ობიექტის შელწევადობაზე.

3. KRR-ს კომბინაციაში პოლიაკრილის მჟავა-გლუტატიონის კონიუგატებთან 76% შეამცირა TEER მაჩვენებელი, გლუტატიონით მოდიფიცირებულ ხიტოზანმა - 80% ხოლო ცალკე გლუტათიონმა - 84%-თ. თუმცა ექსპერიმენტის დამთავრების შემდეგ კულტივირების არეში TEER-ის მნიშვნელობა კვლავ გაიზარდა, რაც მიანიშნებდა იმაზე, რომ ბარიერული მთლიანობის დარღვევა შეუქცევადი პროცესი არ იყო.

4. მიღებული შედეგების მიხედვით დადგინდა, რომ ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდისთვის მუკოაღჭევიური ფორმის შემუშავებისას გლუტათიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანი, შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს პერორალურად მიღებული KRR-ს ბიოშელწევადობის გასაუმჯობესებლად.

დასკვნები

1. შესწავლილ იქნა ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის გრანულომეტრული პარამეტრები. დადგინდა, რომ საკვლევი ნიმუში ხასიათდება ნაწილაკების ზომის მულტიმოდალური განაწილებით და ძირითადად (72.69%) შეიცავს 140 – 250მკმ ზომის ნაწილაკებს და ახასიათებს განაწილების ვიწრო დიაპაზონი ($\sigma = 1.70$), რაც ფხვნილის ჰომოგენურობის მანიშნებელია; $D_{10} = 6.76\text{მკმ}$, $D_{50} = 90.51\text{მკმ}$, $D_{90} = 240.7\text{მკმ}$ და საუტერის საშუალო დიამეტრი: $D(3, 2) = 18.19$.

2. შესწავლილი იქნა KRR-ის რეოლოგიური მაჩვენებლები. დადგინდა, რომ საკვლევი ობიექტი ხასიათდება ცუდი დენადობის უნარით: $AOR = 58.1^\circ$; $I_c = 27.31\%$, $HR = 1.38$, $\alpha'/\alpha_{ref} = 0.37$.

3. შემუშავებულ იქნა KRR-ის HPLC რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდი ბიოლოგიურ სითხეებში; მეთოდი ვალიდირებულია მისი შესაბამისი მახასიათებლებით, დადასტურებულია მაღალი სელექტიურობა, საიმედოობა და სიზუსტე. იმავე დღეს ანალიზის განმეორებით მიღებული სიზუსტის მაჩვენებლის საშუალო მნიშვნელობა იყო 102.1%, R.S.D <5; ხოლო სხვადასხვა დღეს ჩატარებული ანალიზის სიზუსტე იყო 98.4 -104.6% -ის ფარგლებში; R.S.D <9. დეტექტირების ლიმიტი (LOD) = 10ნგ/მლ.

4. შესწავლილია KRR-ის ბიოშელწევადობის უნარი Caco-2 უჯრედებში. დადგინდა, რომ საკვლევი ობიექტისთვის დამახასიათებელია ტიპური P-გუ განპირობებული ტრანსპორტირების თვისებები, მათ შორის პრეფერენციული ტრანსპორტი ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით.

5. შესწავლილ იქნა ბიოდეგრადირებადი პოლიმერების გავლენა KRR-ის ბიოშელწევადობაზე. დადგინდა, რომ ხიტოზან-გლუტატიონის კონიუგატები 1.36-ჯერ აუმჯობესებდნენ აბსორბციულ ტრანსპორტირებას და 2.79-ჯერ ამცირებდნენ ბაზოლატერულს. გლუტატიონი და პოლიაკრილის მჟავა-გლუტატიონის კონიუგატი მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენდა KRR-ის შეღწევადობაზე.

6. *In vitro* კვლევებში დადგინდა, რომ საკვლევი ნივთიერება და ექსპერიმენტში გამოყენებული ბიოდეგრადირებადი პოლიმერები შეუქცევად გავლენას არ ახდენდნენ ნაწლავის ბარიერულ თვისებებზე.

7. მიღებული შედეგების მიხედვით ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდისთვის მუკოადჰეზიური წამლის ფორმის შემუშავებისას გლუტათიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანი შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს პერორალურად მიღებული KRR-ს ბიოშელწვევადობის გასაუმჯობესებლად.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Alania MD. Flavonoids from some species of Astragalus Facaltus of Georgian flora. Monograph., Tbilisi. „Metsniereba”, 2002; 152
2. Alania MD et al. Flavonoids and cycloartans in the manufacturing remains of preparation Flaronin. Proceedings of the Georgian National Academy of Sciences, Chemical series. Tbilisi. 1996; 22:176
3. Alania MD. Method of reception of Robinin from the lieves of Pueraria hirsuta. 1998; Pat. N 2072
4. Amrutha K, Nanjan P, Shaji SK, et al. Discovery of lesserknown flavones as inhibitors of NF-kappaB signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells – a SAR study. Bioorg Med Chem Lett 2014;24(19):4735–4742
5. Balasuriya N, Rupasinghe HP. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. Food Chem 2012;135(4):2320–2325
6. Barta CA, Sachs-Barrable K, Feng F, Wasan KM. Effects of monoglycerideson P-glycoprotein: modulation of the activity and expression in Caco-2 cell monolayers. Mol Pharm 2008;5(5):863-75
7. Berger LM, Wein S, Blank R, et al. Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. J Dairy Sci 2012;95(9):5047–5055
8. Boonpawa R, Moradi N, Spenkelink A, et al. Use of physiologically based kinetic (PBK) modeling to study interindividual human variation and species differences in plasma concentrations of quercetin and its metabolites. Biochem Pharmacol 2015;98(4):690–702
9. Brahmankar DM, Jaiswal S B. Biopharmaceutics and pharmacokinetics-A treatise. 1st ed. Delhi: Vallabh Prakashan Publishers; 1995; 296-297
10. Brambilla B, Le Droumaguet, J. Nicolas, S. H. Hashemi, L.-P. Wu, S. M. Moghimi, P. Couvreur and K. Andrieux, Nanotechnologies for Alzheimer’s disease: diagnosis, therapy, and safety issues., Nanomedicine 2011; 7: 521

11. Brigger, C. Dubernet and P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54, 631–51
12. Casettari L, Vllasaliu D, Mantovani G, Howdle SM, Stolnik S, Illum L, Effect of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan, *Biomacromolecules*, 2010; 11(11): 2854–2865
13. Celik H, Kosar M. Inhibitory effects of dietary flavonoids on purified hepatic NADH-cytochrome b5 reductase: structureactivityrelationships. *Chem Biol Interact* 2012;197(23):103–109
14. Chyeiner V. Phenolic compounds: from plants to foods // *Phytochemistry reviews*. 2012; 11 (2-3):153-177
15. Chen Sh. Einspanier R., Schoen J. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochem Cell Biol.* 2015; 144:509–515
16. Couvreur P. and Vauthier C., Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease., *Pharm. Res.* 2006; 23: 1417–50
17. Cushnie, TPT, Lamb, AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents* 2005; 26: 343-356
18. Das T, Mukherjee S, Chaudhuri K. Effect of quercetin on *Vibrio cholerae* induced nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 expression in intestinal epithelial cells. *Microbes Infect* 2012;14(9):690–695
19. Diab R, Jaafar-Maalej C, Fessi H, Maincent P. Engineered nanoparticulate drug delivery systems: the next frontier for oral administration? *AAPS J* 2012; 14: 688-702
20. Discher D. E. and Ahmed F., Polymersomes., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8:323–41
21. Duggan S., O'Donovan O., Owens E., et all. Comparison of the mucoadhesive properties of thiolated polyacrylic acid to thiolated polyallylamine. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016; 498 (1–2): 245-253

22. During A, Larondelle Y. The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: structure-activity relationships of flavones. *Biochem Pharmacol* 2013;86(12):1739–1746
23. Ensign LM, Cone R, Hanes J, Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The Gastrointestinal mucus barriers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64(6): 557-570
24. European Pharmacopoeia. 8th edition. 2014; 305-308
25. Fischer S, Foerg C, Merkle HP, Gander B. Chitosan coated PLGA–microspheres–a modular system for targeted drug delivery. *Eur Cell Mater* 2004; 7: 11–12
26. Garg R, Gupta GD. Gastroretentive floating microspheres of silymarin: preparation and in vitro evaluation. *Trop J Pharm Res* 2010; 9: 59–66
27. Gaucher G, Satturwar P, Jones MC, Furtos A, Leroux JC, Polymeric micelles for oral drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010; 76(2):147-158
28. Gee, J.M. and Johnson, I.T. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Curr. Med. Chem*. 2001; 8:1245-55
29. Giuliani C, Bucci I, Di Santo S, et al. The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function. *Food Chem Toxicol* 2014;66:23–29
30. Guggi, D., Cast, C.E., & Bernkop-Schnürch, A. In vivo evaluation of an oral salmon calcitonin-delivery system based on a thiolated chitosan carrier matrix. *Pharm. Res.*, 2003; 20(12):1989-94
31. Gunasekaran T, Nigusse T, Dhanaraju MD. Silver nanoparticles as real topical bullets for wound healing. *J Am Coll Clin Wound Spec* 2012; 3: 82-96
32. Hamauzu Y, Nosaka T, Ito F, et al. Physicochemical characteristics of rapidly dried onion powder and its antiatherogenic effect on rats fed high-fat diet. *Food Chem* 2011;129(3):810–815
33. Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, de Pascual-Teresa S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem* 2010;121(3):691–696
34. Hollman Peter C.H. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 2004; 42: 74–83

35. Huang Z, Fang F, Wang J, et al. Structural activity relationship of flavonoids with estrogen-related receptor gamma. *FEBS Lett* 2010;584(1):22–26
36. Huang W, Lee SL, Yu LX Mechanistic approaches to predicting oral drug absorption. *AAPS J.* 2009; 11: 217-224
37. Isoda H, Motojima H, Onaga S, et al. Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. *Chem Biol Interact* 2014;220:269–277
38. Jia L, Zhao Y. Current evaluation of the millennium phytomedicine–ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations. *Curr Med Chem* 2009; 16:2475–2484
39. Kadiyala I, Loo Y, Roy K, Rice J, Leong KW. Transport of chitosan–DNA nanoparticles in human intestinal M–cell model versus normal intestinal enterocytes. *Eur J Pharm Sci* 2010; 39:103–109
40. Kafedjiiski K., Werle M. et all. Synthesis and in vitro characterization of a novel poly(acrylic acid)-glutathione conjugate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2005, 15(6):411-417
41. Kemertelidze E.P, Syrov V.N., Alaniya M.D., Kavtaradze N.Sh., Khushbaktova Z.A. Chemical composition and pharmacological activity of the leaves *Puerariahirsuta* L. growing in Georgia. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2008; 42: 28 – 31
42. Kingston DGI. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod* 2011; 74:496–511
43. Koes R., Verweij W., and Quattrocchio F. , “Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways,” *Trends in Plant Sciences*, 2005; 10(5): 236–242
44. Krych J, Gebicka L. Catalase is inhibited by flavonoids. *Int J Biol Macromol* 2013;58:148–153
45. Kumar, S., & Pandey, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*, 2013; 1-16

46. Kumar A, Vimal A, Kumar A . Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2016; 91: 615-622
47. Kvaratskhelia T., Tsiklauri L. Investigation of technological properties of nephroprotective bioflavonoid. *Proceedings of the Georgian National Academy of Sciences, Chemical Series*, 2017, 43(3:4) 358-362
48. Kvaratskhelia T., Tsiklauri L. The transport of nephroprotective bioflavonoid through polarized monolayers of Caco-2 cells. *Scientific-practical journal: Experimental & Clinical Medicine*, 2019; 1: 57-60
49. Kvaratskhelia T., Tsiklauri L. Bioavailability enhancement of bioflavonoid using biodegradable polymeric materials. *Scientific-practical journal: Experimental & Clinical Medicine*, 2019; 1:43-47
50. Laffleur F B-S. Thiomers: promising platform for macromolecular drug delivery. *Futur Med Chem.* 2012; 4: 2205-2216
51. Letchford K. and Burt H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007; 65:259–69
52. Li G, Zhu Y, Zhang Y, et al. Estimated daily flavonoid and stilbene intake from fruits, vegetables, and nuts and associations with lipid profiles in Chinese adults. *J Acad Nutr Diet* 2013;113(6):786–794
53. Li C., Guo T., Zhou D. et al. A novel glutathione modified chitosan conjugate for efficient gene delivery *Journal of Controlled Release*, 2011, 154: 177–188
54. Liong M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano* 2008; 2: 889-896
55. Lopez M., Martinez F., C. Del Valle, C. Orte, and Miro M., “Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography,” *Journal of Chromatography A*, 2001; 922(1-2): 359–363

56. Lotito SB, Frei B , "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?". *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 41 (12): 1727–46
57. Lrazaro M. L., "Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2009; 9(1):31–59
58. Maciej J, Schaff CT, Kanitz E, et al. Bioavailability of the flavonol quercetin in neonatal calves after oral administration of quercetin aglycone or rutin. *J Dairy Sci* 2015;98(6):3906–3917
59. Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, Souto EB, Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipidnanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2007; 2(4): 595-607
60. Martinez-Fernandez L, Pons Z, Margalef M, et al. Regulation of vascular endothelial genes by dietary flavonoids: structure-expression relationship studies and the role of the transcription factor KLF-2. *J Nutr Biochem* 2015;26(3):277–284
61. Ma Y, Sun R, Hu M. Disposition of Flavonoids Impacts their Efficacy and Safety. *Curr Drug Metab.*; 2014; 15(9):841-64
62. Medda R, Lyros O, Schmidt JL, et al. Anti inflammatory and anti angiogenic effect of black raspberry extract on human esophageal and intestinal microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2015;97:167–180
63. Miyake Y., Shimoi K., Kumazawa S., Yamamoto K., Kinae N., and Osawa T., "Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000; 48(8): 3217–3224
64. Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, et al. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 2008; 133: 116–127
65. Muskovich M, Bettinger CJ. Biomaterials–based electronics: polymers and interfaces for biology and medicine. *Adv Healthc Mater* 2012; 1: 248–266

66. Narayana Raj K., Sripal Reddy M., Chaluvadi M.R., Krishna D.R. Bioflavonoids clasification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 2001; 33: 2-16
67. Nguyen TT, Moon YH, Ryu YB, et al. The influence of flavonoid compounds on the in vitro inhibition study of ahuman fibroblast collagenase catalytic domain expressed in *E. coli*. *Enzyme Microb Technol* 2013;52(1):26–31
68. Oliveira, E.J.; Watson, D.G.; Grant, M.H. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma. *Xenobiotica*, 2002; 32: 279-87
69. Oostendorp RL, Beijnen JH, Schellens JH, The biological and clinicalrole of drugtransporters at the intestinalbarrier, *Cancer Treatment Reviews*, 2009; 35(2):137-147
70. Orhan IE, Senol FS, Ercetin T, et al. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Ind Crops Prod* 2013;41:21–30
71. Pal, RS, Ariharasivakumar, G, Girhepunjhe, K, Upadhay, A. In-vitro antioxidative activity of phenolic and flavonoids compounds extracted from seeds of *Abrus precatorius*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2009; 1: 136-140
72. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sanchez Mata D, Villar A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J Ethnopharmacol* 2001;76:201–214
73. Rabanel JM, Aoun V, Elkin I, Mokhtar M, Hildgen P, Drug-loaded nanocarriers: Passive targeting and crossing of biological barriers, *Current Medicinal Chemistry*, 2012;19(19): 3070-3102
74. Rakers C, Schwerdtfeger SM, Mortier J, et al. Inhibitory potency of flavonoid derivatives on influenza virus neuraminidase. *Bioorg Med Chem Lett* 2014;24(17):4312–4317
75. Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM . "Flavonoids as prospective compoundsfor anti-cancer therapy". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45 (12): 2821–2831

76. Pham-Huy, L.A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 2008; 4:89–96
77. Riehemann K., Schneider S. W. , T. a Luger, B. Godin, M. Ferrari and Fuchs H., Nanomedicine-challenge and perspectives., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009; 48:872–97
78. Roldo, M., Hornof, M., Caliceti, P., & Bernkop-Schnürch, A. Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004; 57 (1):115-121
79. Sanhai W. R., Sakamoto J. H, Canady R. and Ferrari M., Seven challenges for nanomedicine., *Nat. Nanotechnol.* 2008; 3:242–4
80. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, . The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005; 21(1):1-26
81. Sattler, S.; Schäfer, U.; Schneider, W.; Hölzl, J.; Lehr, C.-M. Binding uptake and transport of hypericin by Caco-2 monolayers. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86(10):1120-1126
82. Sahni JK, Baboota S, Ali J. Promising role of nanopharmaceuticals in drug delivery. *Pharma Times* 2011; 43: 16-18
83. Scheepens A, Tan K, Paxton JW. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr* 2010; 5: 75-87
84. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011; 3(1): 89-100
85. Shah RB, Tawakkul MA, Khan MA. Comparative Evaluation of Flow for Pharmaceutical Powders and Granules. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(1):250-258
86. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 105-127
87. Shibata C, Ohno M, Otsuka M, et al. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 2014;462–463:42–48

88. Slütter B, Plapied L, Fievez V, Sande MA, des Rieux A, Schneider YJ, Van Riet E, Jiskoot W, Pr at V, Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination, *Journal of Controlled Release*, 2009; 138(2):113-121
89. Sonaje K, Lin KJ, Wang JJ, Mi FL, Chen CT, Juang JH, Sung HW, Self-assembled pH-sensitive nanoparticles: A Platform for oral delivery of protein drugs, *Advanced Functional Materials*, 2010; 20(21):3695–3700
90. Stewart A. J., Bozonnet S., Mullen W., G. Jenkins I., M. E. Lean, and Crozier A., “Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000; 48(7): 2663–2669
91. Su YL, Fu ZY, Zhang JY, Wang WM, Wang H, Wang YC, et al. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray–drying. *Powder Technol* 2008; 184: 114–121
92. Talaei F, Azhdarzadeh M, Hashemi Nasel H, Moosavi M, Foroumadi AR, Dinarvand R, Atyabi F. Core shell methyl methacrylate chitosan nanoparticles: In vitro mucoadhesion and complement activation, *Daru*. 2011; 19: 257-265
93. Thilakarathna, S. H., Rupasinghe, H.P.V. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 2013, 5(9), 3367–3387
94. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, et al. Drug delivery systems: an updated review. *Int J Pharm Investig* 2012; 2: 2–11
95. Torchilin V. P., Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives., *Pharm. Res.* 2007; 24:1–16
96. Ugocsai K, Varga A, Molnár P, Antus S, Molnár J. Effects of selected flavonoids and carotenoids on drug accumulation and apoptosis induction in multidrug-resistant colon cancer cells expressing MDR1/LRP. *In Vivo*. 2005 Mar-Apr;19(2):433-8
97. Ways T.M.M., Lau W. M., Khutoryanskiy V. V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems *Polymers*. 2018; 10 (267):1-37
98. Wang Y., Chen S., Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011; 91 (4) :949-956

99. Wang F, Wolfson SN, Gharib A, Sagasti A. LAR receptor tyrosine phosphatases and HSPGs guide peripheral sensory axons to the skin. *Curr Biol* 2012; 22: 373–382
100. Wahlang B, Pawar YB, Bansal AK. Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 77: 275–28
101. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C, "Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?". *Free Radical Biology & Medicine.* 2004; 36 (7):838
102. Xiuli Hu X. J., Biodegradable amphiphilic polymer–drug conjugate micelles, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009; 6:1079–1090
103. Yadav D, Suri S, Choudhary AA, Sikender M, Hemant, Beg MN, et al. A novel approach: herbal remedies and natural products in pharmaceutical science as nano drug delivery systems. *Int J Pharm Technol* 2011; 3: 3092-3116
104. Yang Z, Zhu W, Gao S, Yin T, Jiang W, et al. Breast cancer resistance protein (ABCG2) determines distribution of genistein phase II metabolites: reevaluation of the roles of ABCG2 in the disposition of genistein. *Drug Metab Dispos* 2012; 40: 1883-1893
105. Yahara, S., Kohjyouma, M., and Kohoda, H. *Phytochemistry* 2000; 53:469–471
106. Yeon JY, Bae YJ, Kim EY, et al. Association between flavonoid intake and diabetes risk among the Koreans. *Clin Chim Acta* 2015; 439: 225–230
107. Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. Nanoparticle formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1771–1777
108. Zhang J, Wu Y, Zhao X, et al. Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (*Citrus reticulata* cv. *Suavissima*) fruit against cancer cell proliferation and migration. *J Funct Foods* 2014; 10:511–519
109. Zhou, S.F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008; 38: 802–832