



საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის
ქართული უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

**ბიზნესის, კომპიუტინგისა და სოციალურ მეცნიერებათა
სკოლა (ფაკულტეტი)**

საგანმანათლებლო პროგრამა - ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებათა
ქიმია და სამკურნალო პრეპარატების ექსპერტიზა

თამარ კვარაცხელია

**ნეფროპროტექტორული
ბიოფლავანოიდებისათვის ეფექტური
წამალთფორმების შემუშავება**

საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა დოქტორის
აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი
ნაშრომის

სადისერტაციო მაცნე

მიმართულება - 05 საბუნებისმეტყველო მეცნიერებები

თბილისი
2019

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია ფარმაცევტულ საწარმოში "ივერიაფარმას" კვლევით ლაბორატორიაში და საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ბიზნესის, კომპიუტინგისა და სოციალურ მეცნიერებათა სკოლის(ფაკულტეტის) მიმართულებაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: **ლია წიკლაური**
ფარმაცევტულ მეცნიერებათა
აკადემიური დოქტორი

ოფიციალური ოპონენტები: **1. ნუგზარ ალექსიძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი
2. ალექსანდრე სხირტლაძე
ფარმაცევტულ მეცნიერებათა აკადემიური
დოქტორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2019 წლის _____

საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, ბიზნესის, კომპიუტინგისა და სოციალურ მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტის) სადისერტაციო კომისიის სხდომაზე.

მისამართი: 0162, თბილისი, ილია ჭავჭავაძის ქ. №53ა, I კორპუსი,წმიდა ილია მართლის სახელობის საკონფერენციო დარბაზი.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის სამეცნიერო ბიბლიოთეკაში.

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 2019 წლის _____

სადისერტაციო საბჭოს მდივანი,
ნინო დამენია, ბიზნესის მართვის აკადემიური დოქტორი, ასოცირებული პროფესორი

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა - ფლავონოიდები, ბიოლოგიურად აქტიურ ბუნებრივ ნივთიერებათა დიდ კლასს წარმოადგენენ, ფართოდ არიან გავრცელებულნი მცენარეულ სამყაროში და მრავალმხრივი ფარმაცოლოგიური ეფექტურობით ხასიათდებიან, კერძოდ: ანთების საწინააღმდეგო, ჰეპატოპროტექტორული, ნეფროპროტექტორული, ანტიალერგიული, თრომბოლიზური, ანტივირუსული, ანტიკანცეროგენული და სხვა. ფლავონოიდებისადმი ინტერესი განსაკუთრებით ბოლო ათწლეულში გაიზარდა მათი მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობის გამო.

ამავე დროს ფლავონოიდების პერორალურად მიღების დროს მათი ბიომედიკინაობა დაბალია, რითაც იზღუდება მათი თერაპიული მოქმედება. ფლავონოიდების არასრული აბსორბცია იმითაა განპირობებული, რომ მათ არ გააჩნიათ უჯრედის ლიპიდურ მემბრანაში შეღწევის უნარი, დიდი მოლეკულური მასის გამო ცუდად შეიწოვებიან და დაბალია მათი ბიოლოგიური ეფექტურობაც. ჩვენი კვლევის მიზანი სწორედ ამ მდგომარეობის გაუმჯობესება გახლავთ - ფლავონოიდების ბიომედიკინაობის გაზრდა მათი ეფექტურობის გაზრდის მიზნით. კერძოდ ფლავონიდ გლიკოზიდ კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდის (KRR) ნეფროპროტექტორული თვისებების გამოვლენისთვის მნიშვნელოვანია ეფექტური წამალთფორმების შემუშავება და ამით ბიოლოგიური შეღწევადობის გაზრდა.

ამგვარი პრობლემების გადაჭრის ინოვაციურ გზას წარმოადგენს ნანოტექნოლოგიების გამოყენება ფარმაცევტულ დარგში.

ორგანიზმში წამლის მიწოდების სისტემების შემუშავების ტექნოლოგიებში ნანომატარებლები შექმნილია: აქტიური ნივთიერებების დასაცავად *in vivo* დეგრადაციისგან; წამლის შეწოვის გასაუმჯობესებლად ეპითელიუმში ადვილად განაწილების გზით; ფარმაცოკინეტიკის 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.

კვლევის მიზანი. კომპლექსური: ტექნოლოგიური, ფიზიკურ-ქიმიური, ქიმიური და ბიოფარმაცევტული კვლევების საფუძველზე შესწავლილ უნდა იქნეს ნეფროპროტექტორული ფლავონოიდის ბიოშელწევადობა და შერჩეულ იქნეს ორგანიზმში წამლის მიწოდების ოპტიმალური სისტემა. მიზნის მისაღწევად დასახული იქნა შემდეგი სახის ამოცანები:

- KRR-ის რეოლოგიურ-ტექნოლოგიური თვისებების შესწავლა.
- KRR-ის რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდის შემუშავება ბიოლოგიურ სითხეებში.
- KRR-ის სტაბილურობის შესწავლა.
- KRR-ის ნაწლავური შეღწევადობის შესწავლა ადამიანის კოლინჯის ადენოკარცინომული უჯრედების (Caco-2), როგორც ნაწლავის ბარიერის მოდელის გამოყენებით.
- ტიპური P-gp-ით განპირობებული სატრანსპორტო თვისებების შესწავლა.
- მუკოადჰეზიური პოლიმერების გავლენის შესწავლა KRR ნაწლავურ შეწოვაზე.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე. შესწავლილია ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის ტექნოლოგიურ - რეოლოგიური თვისებები. დადგენილია, რომ იგი ხასიათდება ნაწილაკების ზომის მულტიმოდალური განაწილებით და ცუდი დენადობის უნარით, რაც წამლის შესაბამისი ფორმის შექმნის პროცესში სათანადო მიდგომას მოითხოვს.

შემუშავდა KRR-ის HPLC რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდი ბიოლოგიურ სითხეებში; მეთოდის ქრომატოგრაფიული პარამეტრები ადასტურებს შერჩეული სისტემის ვარგისიანობას (შესაბამისობას). მეთოდი ვალიდირებულია შესაბამისი მახასიათებლებით: მაღალი სელექტიურობა, საიმედოობა და სიზუსტე. დეტექტირების ლიმიტი (LOD) = 10ნგ/მლ.

შესწავლილია KRR-ის სტაბილურობა საკვლევ არეებში ასკორბინის მჟავას თანაობისა და მის გარეშე. დადგინდა, რომ საკვლევი ნივთიერება სტაბილურია ექსპერიმენტის მსვლელობისა და ასკორბინის მჟავა დიდ გავლენას არ ახდენს მის მდგრადობაზე.

შესწავლილ იქნა KRR-ის ბიოშელწევადობის უნარი Caco-2 უჯრედებში. მიღებულმა შედეგებმა დაადასტურა, რომ საკვლევი ნივთიერებისთვის დამახასიათებელია ტიპური P-gp განპირობებული ტრანსპორტირების თვისებები, მათ შორის პრეფერენციული ტრანსპორტი ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით. საშუალო აპარენტული შეღწევადობის კოეფიციენტი (Papp) აბსორბციული მიმართულებით 2.14-ჯერ უფრო მეტი იყო ვიდრე სეკრეტორული მიმართულებით. P-gp-ის ინჰიბიტორის - ვერაპამილის თანაარსებობა მნიშვნელოვნად ამცირებს

KRR-ის ტრანსპორტს BL→ AP მიმართულებით და 1.6 ჯერ ზრდის ბაზოლექტარულ ტრანსპორტს.

შესწავლილია ნეფროპროტექტორული ფლავონოიდის შეღწევადობაზე მუკოადჰეზიურ წამლის ფორმებში გამოყენებული ბიოდეგადირებადი პოლიმერების გავლენა Caco-2 მონოშიან უჯრედებზე. დადგინდა, რომ აბსორბციული ტრანსპორტირება ქიტოზან-გლუტატიონის კონიუგატების არსებობისას 1.36-ჯერ გაუმჯობესდა ხოლო ბაზოლექტარულიდან აპიკალური მიმართულებით გამოდევნა 2.79 -ჯერ შემცირდა. გლუტატიონი ცალკე და პოლიაკრილის მჟავა-გლუტატიონის კონიუგატი მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენდნენ საკვლევი ობიექტის შეღწევადობაზე.

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

კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები. საკვლევი ობიექტის 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. საკვლევი ნიმუშის გრანულომეტრული ანალიზი ჩატრდა სტანდარტული საცრების Retsch VE1000 (Haan, Germany) და ლაზერული დიფრაქტომეტრით (LS 100 Q Instrument (Beckman Coulter Particle Characterization) ევროპის ფარმაკოპეის 8.0 მიხედვით.

ფხვნილის რეოლოგიური პარამეტრების განსაზღვრა მოხდა tap tester -ის (tapping machine (J. Englesman, Ludwigshafen, Germany) და Powder Flow Tester (FT 300) -ის გამოყენებით ევროპის ფარმაკოპეის მეთოდების შესაბამისად.

ბიომეღწევადობა შესწავლილ იქნა In vitro მეთოდით: ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო Caco-2 უჯრედები, რომელთა მთლიანობა დგინდებოდა ტრანსეპითელიარული ელექტრული რეზისტენტობის (TEER) მნიშვნელობის განსაზღვრით.

მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავება და ანალიზი ჩატრდა სტუდენტის ტესტის მიხედვით. მნიშვნელობის მინიმალური დონე $p < 0.005$. ყველა მონაცემი მინიმუმ 3 ექსპერიმენტის საშუალო მაჩვენებელია.

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა. ბიოფარმაცევტული კვლევების საფუძველზე შესწავლილია KRR-ს ბიომეღწევადობის უნარი ადამიანის მსხვილი ნაწლავის ადენოკრცინომის Caco-2 უჯრედებში.

დადგენილია, რომ KRR-ის ტრანსპორტირებაში ჩართულია P-gp, რაც მის ბიოშელწვევადობას ამცირებს პერორალური მიღებისას.

კვლევების საფუძველზე შერჩეულ იქნა მუკოადჰეზიური წამლის ფორმა და შესაბამისი პოლიმერები. დამუშავებულია მუკოადჰეზიური ტაბლეტების პირველადი რეცეპტურა.

ნაშრომის სტრუქტურა და მოცულობა. დისერტაცია მოიცავს: ანოტაციას (ქართულ და ინგლისურ ენებზე), შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას; ექსპერიმენტულ ნაწილს, რომელშიც აღწერილია საკვლევი ობიექტები, კვლევის მეთოდები, საკუთარი კვლევის შედეგები, მათი განხილვა და დასკვნები, გამოყენებული ლიტერატურის სიას სადაც 109 წყაროა მითითებული. შრომა ილუსტრირებულია 7 ცხრილით, 15 სქემით და 43 სურათით. ნაშრომის მოცულობა 109 გვერდია.

ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

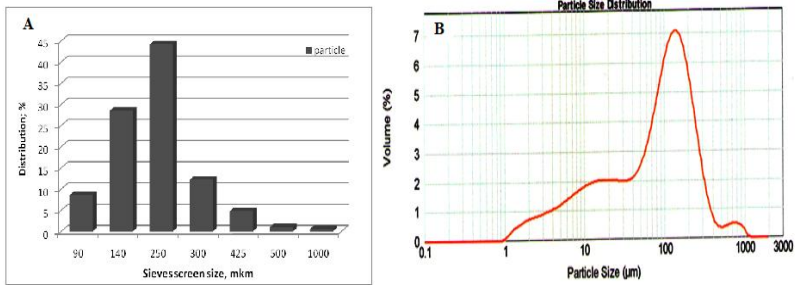
სამუშაოს კვლევის ობიექტებს წარმოადგენდა - კემფეროლ-3-O-რობინოზიდი-7-O-რამნოზიდი (KRR). CAS N: 301-19-9. ნედლეული: მცენარე Robinia pseudoacacia L. ფოთლები. ხიტოზანი CAS N: 9012-76-4- (საშუალო მოლეკულური მასა: 400 kDa; დეაციტილირების ხარისხი: 83-85%); L-გლუტათიონი - ალდგენილი ფორმა (GSH), CAS N: 70-18-8; MW: 307.32, პოლიაკრილის მჟავა (PAA) - CAS N 9003-01-4; MW: 1800; ხარის ემბრიონის შრავი (FCS) (NR. 26140-079); N-(2- ჰიდროქსიეთილ) პიპერაზინ -N-(2-ეთანესფონურიმჟავა) (HEPES), მინიმალური აუცილებელი გარემო (MEM) და სხვა დანარჩენი რეაგენტები და გამხსნელები მიღებული Sigma-სგან. ყველა ქიმიური გამხსნელი და ნივთიერება იყო ანალიზური სისუფთავის.

ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის ტექნოლოგიური პარამეტრების შესწავლა. აქტიური ფარმაცევტული ინგედიენტების ტექნოლოგიური პარამეტრების განსაზღვრა მნიშვნელოვანია წამლის ოპტიმალური ფორმის შერჩევისა და შემუშავებისათვის. ჩვენი კვლევის მიზანი იყო ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის KRR-ს ტექნოლოგიური თვისებების, კერძოდ ნაწილაკების ზომა და განაწილება, მოცულობითი და შემჭიდროებითი სიმკვრივეები, დენადობის უნარი - შესწავლა.

ნაწილაკების ზომა განისაზღვრა სტანდარტული საცრებისა და ლაზერული დიფრაქტომეტრის მეთოდებით. მიღებული მონაცემების მიხედვით (სურათი 1. A, B) საკვლევი ნიმუში ძირითადად წარმოდგენილი იყო ნაწილაკებისგან, რომელთა ზომა მერყეობდა 140 – 250 μ m ფარგლებში (72.69%); ნაწილაკთა ზომის განაწილების ვიწრო დიაპაზონი (σ = 1.70) ფხვნილის ჰომოგენურობის მანიშნებელია. დადგენილ იქნა საკვლევი

ფხვნილისთვის ძირითადი პარამეტრები: $D_{10} = 6.76\mu\text{m}$, $D_{50} = 90.51\mu\text{m}$, $D_{90} = 240.7\mu\text{m}$ და საუტერის საშუალო დიამეტრი: $D(3, 2) = 18.19$.

როგორც სურათი 1 B - დან ჩანს, KRR ხასიათდება ნაწილაკების ზომის მულტიმოდალური განაწილებით; ყველაზე მაღალი პიკი დაახლოებით $100\text{-}250\mu\text{m}$ (მოდალური დიამეტრი - $116.03\mu\text{m}$) ხოლო დაბალი პიკი დაახლოებით $700 - 800\mu\text{m}$ ზომის ნაწილაკების დიაპაზონებშია მოთავსებული; დაბალი პიკის არსებობა სავარაუდოდ განპირობებულია სისტემაში აგლომერირებული ნაწილაკების არსებობით; აღნიშნული პიკის ვიწრო სიგანე და დაბალი სიმაღლე ადასტურებს საკვლევის ნივთიერების ჰომოგენურობას. სხვაობა საცრული ანალიზითა და ლაზერული დიფრაქტომეტრით მიღებულ მაჩვენებლებს შორის განპირობებულია თითოეული მეთოდით მიღებული განსხვავებული საზომი ერთეულებით.

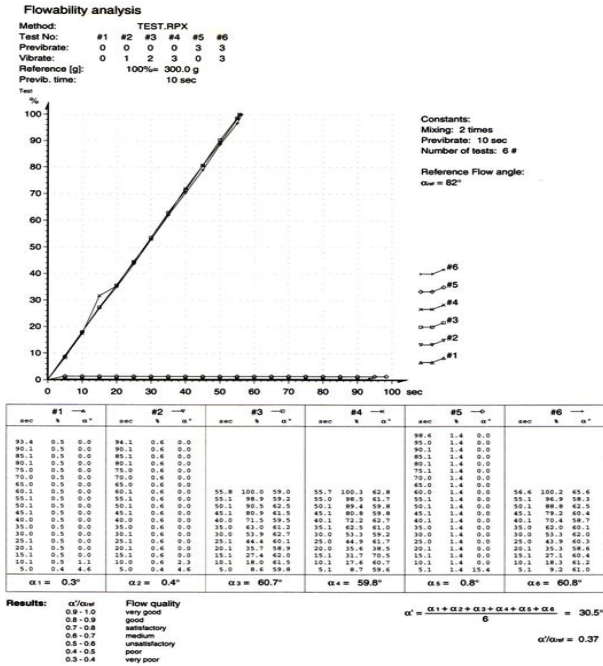


სურათი 1. KRR-ში ნაწილაკების ზომის განაწილება სტანდარტული საცრებით (A) და ლაზერული დიფრაქტომეტრით (B). $n=3; \pm \text{SD}$.

ფხვნილის დენადობაზე გავლენას ახდენს ნაწილაკების ისეთი პარამეტრები როგორცაა ზომა, ფორმა და ზომის ცვალებადობა. Carr კოეფიციენტი და მასთან დაკავშირებული ჰასნერის ინდექსი (Hausner ratio) არის ფხვნილის დენადობის მახასიათებლების პროგნოზირების მარტივი და სწრაფი მეთოდი და განისაზღვრება ნაყარი და შემჭიდროებული ფხვნილის მოცულობების გაზომვით. 1.25-ზე მეტი ჰასნერის ინდექსის ($p_{\text{max}}/p_{\text{min}}$) მნიშვნელობამიუთითებს ფხვნილის დაბალ დენადობის უნარზე, ხოლო უფრო ნაკლები მაჩვენებლები ასოცირდებიან ზომიერ და საუკეთესო დენადობასთან; Carr index ($[(p_{\text{max}} - p_{\text{min}}) / p_{\text{max}}]100\%$) -ის 20%-ზე მაღალი მაჩვენებელი დაბალ დენადობაზე, ხოლო 15%-ზე დაბალი - საუკეთესო დენადობაზე მიუთითებს.

თავისუფალად 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. თუმცა, მარტო ეს მაჩვენებლები ადეკვატურად ვერ აფასებენ ფხვნილის დენადობის უნარს. KRR-ის დენადობის უნარის დასახასიათებლად დენადობის საშუალო მაჩვენებლის (α'/α_{ref}) განსაზღვრა მოხდა FLOWTESTER ზე და საშუალო დენადობის მაჩვენებელი შეფასდა წრფივი რეგესით (სურათი 2).



სურათი 2. FLOW TESTER-თ განსაზღვრული KRR-სდენადობის ანალიზი.

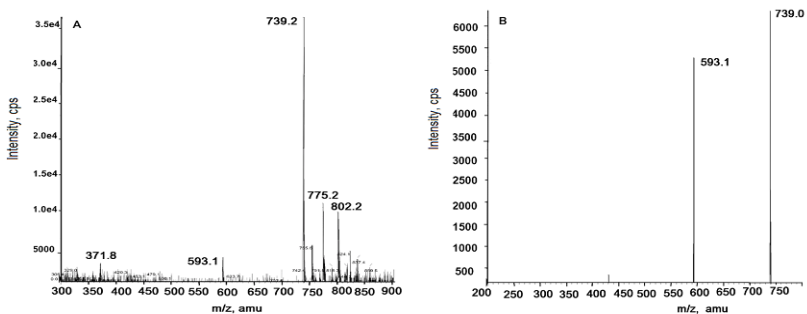
საკვლევი ობიექტის ტექნოლოგიური პარამეტრების მონაცემები წარმოდგენილია ცხრილი 1-ში. მიღებული შედეგების საფუძველზე KRR-ის დენადობა შეფასდა როგორც „ძალიან დაბალი“ გამომდინარე მისი დაწნევის ინდექსის ($I_c = 27.31\%$), ჰასნერის ($HR = 1.38$) და დენადობის კოეფიციენტების ($\alpha'/\alpha_{ref} = 0.37$) და თავისუფლად დაყრილი ფხვნილის მიერ შექმნილი კუთხის ($AOR = 58.15^\circ$) მნიშვნელობებიდან და სამკურნალო ფორმის შემუშავებისას მოითხოვს კრიტიკულ მიდგომას დამხმარე ნივთიერებების შესარჩევად.

ცხრილი 1. KRR-ის რეოლოგიური კვლევის შედეგები

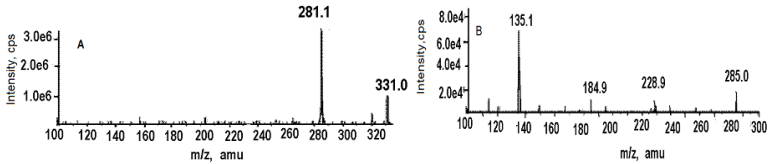
ნივთიერება	მოცულობითი სიმკვრივე (g/cm ³)	შემჭიდროვებითი სიმკვრივე (g/cm ³)	Ic (%) (≤20%)	HR ≤1.2	AOR° (≤45-50°)	α'/aref
	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD	საშუალო ± SD
KRR	0.50 ± 0.05	0.69 ± 0.07	27.31 ± 1.09	1.38 ± 0.02	58.15 ± 1.14	0.37

KRR-ის რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდის შემუშავება ბიოლოგიურ სითხეებში. ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის ბიომედეცინის შესაფასებლად ბიოლოგიურ სითხეებში შემუშავდა მისი რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდი. KRR-ის შიდა სტანდარტი - ფისეტინი - შერჩეულ იქნა საკვლევი ნივთიერების მახასიათებლების გათვალისწინებით.

მას-სპექტრალური პარამეტრების ოპტიმიზაციის მიზნით მომზადებულ იქნა KRR და ფისეტინის სტანდარტული ხსნარები მეთანოლის წყლიან ხსნარში. ანალიზი ჩატარდა ტანდემურ სითხურ მას-სპექტროფოტომეტრზე (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA); ქრომატოგრაფიული დაყოფა ხდებოდა XTerra MS C18 სვეტზე (2.1×100mm i.d., 3.5_μm; Waters Corporation, Milford, MA, USA). 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 3 და 4).

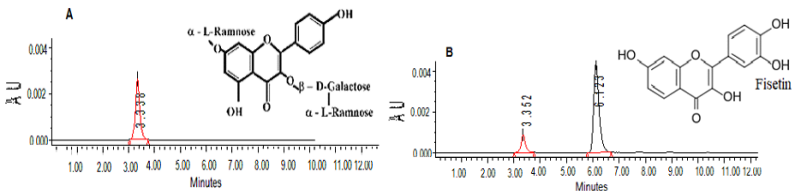


სურათი 3. KRR-ის Q1 სრული (A) და მისი პროდუქტის იონის (B) სკანირების მას-სპექტრები. მას-სპექტრის გადაღება მოხდა 1 μg/ml ფისეტინის წყლიან მეთანოლის (50:50, v/v) ხსნარის პირდაპირი ინფუზიით.



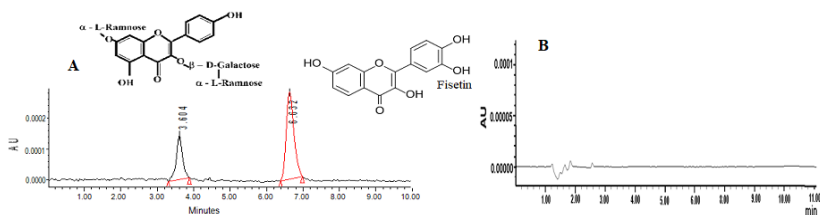
სურათი 4. ფისეტინის Q1 სრული (A) და პროდუქტის იონის სკანირების მას-სპექტრები. მას-სპექტრის გადაღება მოხდა 1 $\mu\text{g/ml}$ ფისეტინის წყლიანი მეთანოლის (50:50, v/v) ხსნარის პირდაპირი ინფუზიით.

ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო Waters HPLC სისტემა (Milford, MA, USA). საკვლევის ობიექტის შიდა სტანდარტისგან ოპტიმალური დაყოფა მიღწეულ იქნა შერჩეულ ფაზიანი სვეტის Platinum EPS C-18 (250x4,6 მმ i.d., 5მკმ, შექმნილი Alltech Associates, Inc.-დან) გამოყენებით, რომელიც ხასიათდება ფართო დიაპაზონის სელექტიურობით. მობილური ფაზის შერჩევითვის შესწავლილ იქნა სხვადასხვა 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 μm მეტრიანი 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 3-ჯერ. 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 5).



სურათი 5. 1 მკგ/მლ კონცენტრაციის KRR-ის (A) და ფისეტინის (B) ქრომატოგამები მობილურ ფაზაში.

KRR-ის ბიოლოგიურ სითხეებში რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდის ოპტიმიზაციისთვის გამოყენებულ იქნა Caco 2 უჯრედების ლიზატები. საკვლევი ნივთიერება და ფისეტინი იხსნებოდა დიმეთილსულფოქსიდში (DMSO) კონცენტრაციით 1mg/ml და 0.25 mg/ml შესაბამისად და ზავდებოდა მეთანოლით. საკალიბრო მრუდის ასაგებად KRR ემატებოდა სუფთა უჯრედების ლიზირებულ ხსნარს იმგვარად, რომ მიღებულ იყო 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.

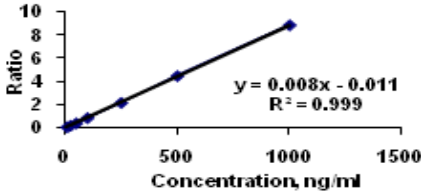


სურათი 6. Caco-2 უჯრედებში აკუმულირებული 50 ნგ/მლ KRR-ის და 20 ნგ/მლ ფისეტინის (A) და Caco-2 უჯრედების ლიზატების ექსტრაქტის (B) ქრომატოგრამები.

ანალიზის დაწყებამდე ნიმუშებს ემატებოდა თანაბარი მოცულობის მეთანოლი ცილების დასალექად. ცილების დაცენტრიფუგირება ხდებოდა 13000rpm-ზე 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 µl მობილურ ფაზაში და გამოყენებული იყო HPLC-ის ანალიზისთვის. ექსპერიმენტის მსვლელობისას არ დაფიქსირებულა ხელის შემშლელი პიკების კო-ელუირება და ამ ქრომატოგრაფიულ პირობებში მიღწეულ იქნა ფლავონოიდების კარგი დაყოფა (სურათი 6). რაოდენობრივი შეფასება ეფუძნებოდა პიკის ფარდობის გამოთვლას, ამავე დროს ხდებოდა სტანდარტების საკალიბრაციო მრუდის შედარება.

KRR-ის საკალიბრო მრუდი აიგო საანალიზო ნივთიერების / შიდა სტანდარტის პიკების ფართობის თანაფარდობისა და საანალიზო ნივთიერების კონცენტრაციას შორის დამოკიდებულების გრაფიკით, რომელიც იყო სწორხაზოვანი 25 დან - 1000 ნგ/მლ კონცენტრაციის დიაპაზონში (სურათი 7). 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.



სურათი 7. საკალიბრო მრუდი KRR-ის მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიული ანალიზისთვის უჯრედების ლიზატების ხსნარში. შიდა სტანდარტი - ფისეტინი. $n=3$; \pm SD.

იმავ 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 (ცხრილი 2). მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ შემუშავებული მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიული მეთოდი ხასიათდება დამაკმაყოფილებელი სიზუსტით.

ცხრილი 2 მეთოდის ვალიდაციის შედეგები

საანალიზო ნივთიერება	მიზნობრივი კონცენტრაცია (მკგ/მლ)	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

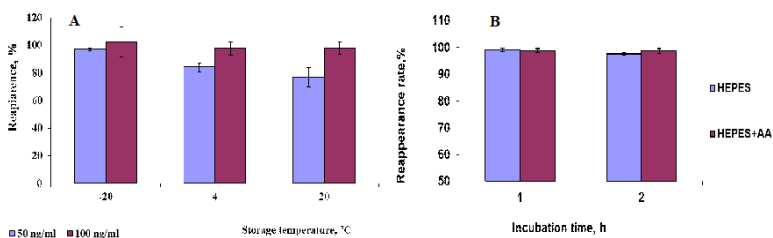
* -სამი განსზღვრის საშუალო მაჩვენებელი

ფარდობითი სტანდარტული გადახრა (R.S.D.), რომელიც გამოიყენება საიმედოობის შესაფასებლად, საკვლევი ნიმუშისთვის იყო 5 -ის ქვევით დღის განმავლობაში, და 9 -ს ქვევით სხვადასხვა დღეებში განმეორებითობისას. RSD-ის დაბალი მნიშვნელობა მიუთითებს მეთოდის აღწარმოებადობასა და რეპროდუქციულობაზე. დეტექტირების ლიმიტი (LOD) - ნიმუშის ის უმცირესი კონცენტრაცია, რომლის აღმოჩენაც შესაძლებელია ჩვენს მიერ შემუშავებული ანალიზის მეთოდით იყო 10 ნგ/მლ.

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. მოძრავ ფაზაში აღმოჩენილი ნივთიერების რაოდენობა მიჩნეულ იქნა 100 %-ად (სურათი 5). ექსტრაქციის ეფექტურობის საშუალო მნიშვნელობა KRR-თვის ვარირებდა 61 -დან - 70%-ის ფარგლებში.

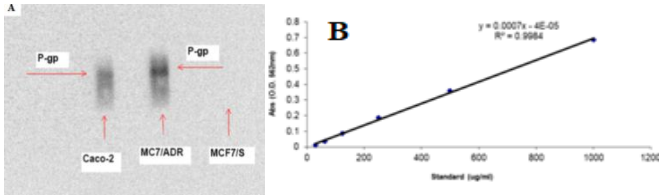
იმისათვის რომ დადგენილიყო, ექსპერიმენტის მსვლელობაში ადგილი ხომ არ ჰქონდა საკვლევი ობიექტის ჰიდროლიზს შესწავლილ იქნა KRR-ის სტაბილურობა მობილურ ფაზასა და HEPES არეში ასკორბინის მჟავას თანაობისას და მის გარეშე. დადგენილ იქნა, რომ KRR სტაბილურია შენახვის სხსხ პირობებში და ასკორბინის მჟავა დიდ გავლენას არ ახდენს მის სტაბილურობაზე. ფლავანოიდის საშუალო რედუქციური უნარი - 20 და 20°C-ტემპერატურაზე შენახვისას იყო 76.9 - 97 % -ის და 97.7-102.2 % - ის ფარგლებში შესაბამისად 50 და 100 ნგ/მლ კონცენტრაციებისთვის (სურათი 8); ხოლო HEPES არეში - 97.64-99.1% -ის და 98.67-98.82% ის ფარგლებში ასკორბინის მჟავას გარეშე და მისი თანაობისას.



სურათი 8. შენახვის ტემპერატურის და HEPES არეს გავლენა KRR-ის სტაბილურობაზე. n=3; ± SD.

KRR-ის ბიომედეცადობის შესწავლა in-vitro ექსპერიმენტში. ჩვენი კვლევის შემდგომ მიზანს წარმოადგენდა ნეფროპროტექტორული KRR -ის ბიომედეცადობის შესწავლა ადამიანის კოლინჯის ადენოკარცინომულ ურედებზე (Caco-2), რომლებიც ნაწლავური შეწოვის შესწავლისათვის ფართოდ გამოიყენება მისი განსაკუთრებული უნარის გამო - მოდელირება გაუკეთოს ადამიანის აბსორბციის მახასიათებლებს და გამოხატოს განვითარებული ენტეროციტის რამდენიმე მორფოლოგიური და ფუნქციური თვისება.

კვლევის დაწყებამდე ვესტერნ ბლოტის ანალიზით დადგინდა P-gp-ის ექსპრესია იმ Caco-2 უჯრედებში, რომლებიც გამოყენებული იყვნენ წარმოდგენილ კვლევებში (სურათი 9 A). MCF-7/სენსიტიური და MCF-7/ADR უჯრედები წარმოდგენილი იყო P-gp-ის როგორც ნეგატიური და პოზიტიური კონტროლი.



სურათი 9. P-gp-ის ექსპრესია MCF-7/სენსიტიური, MCF-7/ADR და Caco-2 უჯრედებში (A); P-gp რაოდენობრივი განსაზღვრის საკალიბრო მრუდი ვესტერნ ბლოტინგით (B).

სტანდარტული მრუდის საშუალებით განსაზღვრულ იქნა იმუნობლოტინგური ნიმუშები. საკალიბრო მრუდი სწორხაზოვანი იყო სტანდარტის 1500 ug/ml-მდე; ყველა ნიმუში განსაზღვრული იყო აღნიშნულ დიაპაზონში (სურათი 9 B).

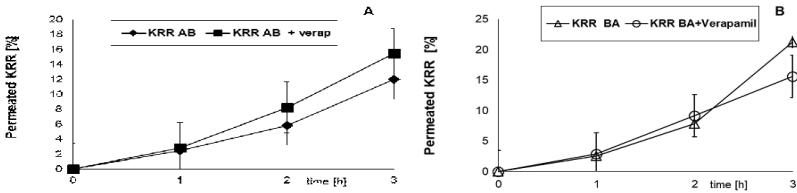
KRR-ის ბიომედეცადობის შესწავლისთვის უჯრედების კულტივირება ხდებოდა 24 დღის განმავლობაში. ექსპერიმენტში გამოიყენებოდა ის უჯრედები, რომელთა TEER-ის მნიშვნელობა იყო 500 - 600 Ω cm² ფარგლებში. ორმხრივი ტრანსპორტირების ექსპერიმენტი ე.ი. აპიკალური ნაწილიდან \rightarrow ბაზოლატერულის (AP \rightarrow BL) და ბაზოლატერულიდან \rightarrow აპიკალურ (BL \rightarrow AP) მხარეს, ჩატარდა მინიმუმ სამჯერ; საკვლევი ობიექტის კონცენტრაცია იყო 20 μ g/mL. ტრანსპორტირების ექსპერიმენტის მსვლელობისას საკნის ორივე მხარეს MEM-ის ჩანაცვლება მოხდა HEPES ბუფერით (pH 6.8). საკვლევი ხსნარი ემატებოდა დონორ და რეციპიენტ მხარეს. TEER-ს გაზომვა ხდებოდა საათში ერთხელ; აქცეპტორის მხრიდან ნიმუშების აღება ხდებოდა 200 μ L ოდენობით. კვლევის დასრულებისას Caco-2 უჯრედები დატოვებულ იქნა რეგენერაციისათვის შემდგომი 24 საათით CO₂ ინკუბატორში. საკვლევი ნიმუშები ცენტრიფუგირდებოდა 15000გ სიჩქარეზე 5 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე; 50 μ L ნალექზედა სითხის ანალიზი ჩატარდა HPLC მეთოდით. KRR-ს ტრანსპორტირების ინჰიბირება შესწავლილ იქნა P-gp-ის საყოველთაოდ ცნობილი ინჰიბიტორის - ვერაპამილის (100 μ M) გამოყენებით.

საკვლევი ნივთიერების შეღწევადობის აპარენტული კოეფიციენტის - Papp (cm/s) გამოთვლა ხდებოდა ტოლობით: $Papp = (\Delta Q/\Delta t) / (A \times C_0)$. სადაც, $\Delta Q/\Delta t$ არის საკვლევი ნაერთის შეღწევადობის კოეფიციენტი (μ g/s), A - მონომრიანი უჯრედის ზედაპირის ფართობი (cm²), ხოლო C₀ საკვლევი ნივთიერების საწყისი კონცენტრაცია (μ g /mL) დონორულ ნაწილში.

ტრანსპორტირების პროცენტულობა გამოითვლებოდა რეციპიენტ დანაყოფში შეღწეული KRR-ის რაოდენობის თანაფარდობით დონორ

დანაყოფში არსებულ საწყის კონცენტრაციასთან X 100. ტრანსპორტირების მონიტორინგი ხდებოდა 3 საათის განმავლობაში.

მიღებული შედეგების მიხედვით (სურათი 10) KRR ამჟღავნებს ორმხრივი ტრანსპორტირების უნარს; მისი BL → AP დინების მაჩვენებელი უფრო მაღალი აღმოჩნდა AP → BL-თან შედარებით; საკვლევი ნაერთის საშუალო აპარენტული შეღწევადობის კოეფიციენტი (Papp) აბსორბირებული მიმართულებით 2.14 ± 0.61 -ჯერ ($P_{ratio} > 2$) უფრო მეტი იყო ვიდრე სეკრეტორული მიმართულებით. P-gp-ით გამოდევნამ გამოიწვია ბაზოლატერული ტრანსპორტირების ზრდა აბსორციულთან შედარებით. ვერაპამილის თანაობისას მნიშვნელოვნად შემცირდა KRR-ის ტრანსპორტი BL → AP მიმართულებით და გაიზარდა (1.6 ჯერ) AP → BL მიმართულებით, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ისეთი სპეციფიური გამოდევნის სისტემები, როგორცაა P-gp შესაძლებელია ჩართულნი იყვნენ KRR-ის ბიოშელწევადობის პროცესში.



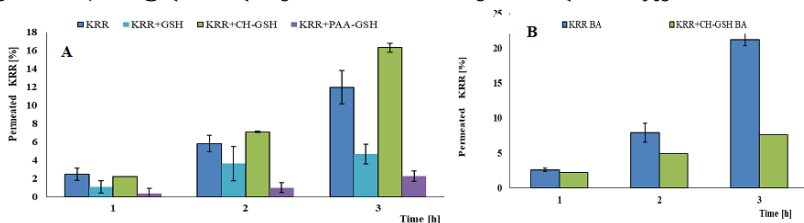
სურათი 10. KRR-ის ტრანსეპითელური ტრანსპორტირება Caco-2 უჯრედებში აბსორბირებული (A) და სეკრეტორული (B) მიმართულებით ვერაპამილის გარეშე და მისი თანაობისას. n=3; ± SD.

KRR-ის შეღწევადობის გაუმჯობესება ბიოდეგადირებადი პოლიმერების გამოყენებით. კვლევის შემდგომი მიზანი იყო მუკოადჰეზიური პოლიმერების გავლენის შესწავლა KRR-ის ნაწლავურ აბსორბაციაზე. საკვლევი ობიექტის ბიოფარმაცევტული პარამეტრების გათვალისწინებით შერჩეულ იქნა შემდეგი პოლიმერები: ხიტოზანი (CH), აღდგენილი გლუტათიონი (GSH), ხიტოზან-გლუტათიონის და პოლი-აკრილის მჟავა - გლუტათიონის (PAA-GSH) კონიუგატები. ბიოშელწევადობა შესწავლილ იქნა 500 - 600 Ω cm² TEER-ის მქონე Caco-2 მონოშირან უჯრედებზე. ექსპერიმენტი მიმდინარეობდა ზემოთ აღწერილ პირობებში. ორმხრივი ტრანსპორტირების კვლევები, ე.ი. აპიკალური ნაწილიდან → ბაზოლატერულის (AP → BL) და ბაზოლატერულიდან → აპიკალურ (BL → AP) მხარეს, ჩატარდა მინიმუმ სამჯერ; საკვლევი ობიექტის კონცენტრაცია იყო 20 µg/mL.

ექსპერიმენტის მსვლელობისას საკნის ორივე მხარეს MEM-ის ჩანაცვლება ხდებოდა HEPES ბუფერში მომზადებული GSH, CH-GSH ან

PAA-GSH და საკვლევი ნივთიერების ხსნარებით. TEER იზომებოდა საათში ერთხელ; აქცეპტორის მხრიდან ნიმუშების აღება და სატრანსპორტო არით ჩანაცვლება ასევე ხდებოდა საათობრივად. აბსორბირებული საკვლევი ნაერთის რაოდენობრივი ანალიზი ტარდებოდა HPLC მეთოდით.

მიღებული შედეგების მიხედვით გლუტათიონი და პოლიაკრილის მჟავის კონიუგატი გლუტათიონთან - მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენენ KRR-ის გადატანის ეფექტურობაზე აპიკალურიდან ბაზოლატერული მიმართულებით ცალკე საკვლევი ნივთიერების ტრანსპორტირებასთან შედარებით (სურათი 11 A). გლუტათიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანი ავლენდა KRR-ის შეღწევადობის გაუმჯობესების მაღალ ეფექტს თავისუფალ ბიოფლავონოიდთან შედარებით - KRR-ის ტრანსპორტირების უნარი აღნიშნული პოლიმერის თანაობისას გაიზარდა 1.36-ჯერ.

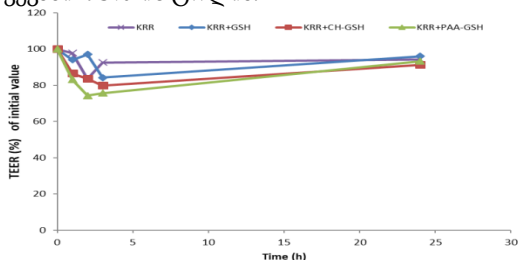


სურათი 11. პოლიმერების გავლენა KRR-ის აბსორბციულ ტრანსპორტზე (A) და CH-GSH გავლენა ბაზოლატერულ ტრანსპორტზე (B) Caco-2 ერთშირთან უჯრედებში. n=3; ± SD.

საკვლევი ნაერთის ბაზოლატერულ ტრანსპორტირებაზე მოდიფიცირებული ხიტოზანის გავლენის შესწავლამ აჩვენა, რომ (სურათი 11 B) CH-GSH-ს კომბინაციაში KRR-ის გამოდევნა ბაზოლატერულიდან აპიკალური მიმართულებით მნიშვნელოვნად უფრო სუსტია ვიდრე მარტო KRR-ის; საკვლევი ობიექტის შეღწევადობის საშუალო აპარენტული კოეფიციენტი (Papp) აბსორბციული მიმართულებით 2.79 ± 0.91 - ჯერ უფრო დაბალი იყო გლუტათიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანის თანაობისას ვიდრე სუფთა KRR-ის შემთხვევაში. მიღებული შედეგები საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ხიტოზან-გლუტათიონის კონიუგატს შეუძლიათ გააუმჯობესოს საკვლევი ფლავონოიდის ტრანსპორტირება ერთშირთან Caco-2 უჯრედებში.

ცალკე საკვლევი ობიექტის და ასევე სხვადასხვა პოლიმერებთან მისი კომბინაციების შექცევადი ეფექტის შესწავლის შედეგები ნაწლავის ბარიერულ თვისებებზე და ჩამკეტი ზონის გამლაზე მოცემულია სურათზე 12., საიდანაც ჩანს, რომ 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 ტოლია.



სურათი 12. KRR, KRR+GSH, KRR+CH-GSH და KRR+PAA-GSH-ისგავლენა Caco-2 უჯრედების TEER რეზისტულობაზე. $n=3; \pm SD$.

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 ბმების შესუსტებაზე, ე.ი. გაიხსნა უჯრედშორისი გზები ჩვეულებრივ დაბალი ბიომედეცადობის 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.

კვლევის შემდგომ ეტაპს წარმოადგენდა შერჩეული პოლიმერით KRR მუკოადჰეზიური ტაბლეტების მომზადება და მათი ბიომედეცადობის შედარება საკონტროლო ტაბლეტებთან საკვლევი ნივთიერებით. ამ მიზნით ჩვენს მიერ გამოკვლეულ იქნა KRR მუკოადჰეზიური სისტემის ორი ნიმუში: F 1 და F 2. F 1 -ში აქტიური ნივთიერება იყო გახსნილი მინიმალური ოდენობის დიმეთილსულფოქსიდიში, ხოლო F 2 -ში - მინიმალური ოდენობის ეთანოლში. მომზადებული მუკოადჰეზიური ტაბლეტები შედგებოდა მუკოადჰეზიური მატრიცისაგან (20 მგ), რომელშიც დისპერგირებული იყო KRR (25%); ლიოფილიზირებული CH-GSH (70%) და GSH (5%) და გამყოფი შრისგან - გრანულატი (ტაბლეტის მასის 42%); ტაბლეტების დაწნევა მოხდა 8 kN წნევის ქვეშ; მიიღებოდა 5მმ დიამეტრის და 1მმ სიმაღლის ტაბლეტები. ყველა ტაბლეტის შემოგარსვა ხდებოდა ნაწლაგში ხსნადი გარსით Eudragit L 100-ით(Germany).

ბიომედწვეადობის 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. 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. მემზრანის 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.

მუკოადჰეზიურობა პირდაპირ ასოცირდება გაჯირჯვების უნართან. მუკოადჰეზიური პოლიმერების გაჯირჯვების მახასიათებლები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ ადჰეზიურ თვისებებსა და კოგეზიურობის უნარზე. 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. მიღებული შედეგების მიხედვით Ch-GSH-ის შემცველი ტაბლეტების მასა 90 წუთის შემდეგ გაიზარდა დაახლოებით 137.14%-ით, ხოლო შემოუფარსავი, მარტო საკვლევი 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.

მუკოადჰეზიური სისტემიდან (F1 ფორმულაცია) KRR-ის გამოთავისუფლების სიჩქარე შეისწავლებოდა *in vitro* მეთოდით (USP 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 გაგმელდება სამუშაოები ამ მიმართულებით.

დასკვნები

1. შესწავლილ იქნა ნეფროპროტექტორული ბიოფლავონოიდის გრანულომეტრული თვისებები. დადგინდა, რომ საკვლევი ნიმუში ხასიათდება ნაწილაკების ზომის მულტიმოდალური განაწილებით და ძირითადად (72.69%) შეიცავს 140 – 250 μ m ზომის ნაწილაკებს და ახასიათებს განაწილების ვიწრო დიაპაზონი(σგ = 1.70), რაც ფხვნილის ჰომოგენურობის მანიშნებელია; D_{10} = 6.76 μ m., D_{50} = 90.51 μ m., D_{90} = 240.7 μ m 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°; I_c = 27.31%, HR = 1.38, α'/α_{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 ბიომელწევადობის 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 ბიომელწევადობაზე. 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 გლუტატიონით მოდიფიცირებული ხიტოზანი შესაძლებელია

გამოყენებულ იქნეს პერორალურად მიღებული KRR-ს ბიომეღწევადობის გასაუმჯობესებლად.

**დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული პუბლიკაციების ნუსხა
სტატიები:**

1. 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.
2. 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.
3. Kvaratskhelia T., Tsiklauri L. Bioavailability enhancement of bioflavonoid using biodegradable polymeric materials. Scientific-practical journal: Experimental & Clinical Medicine, 2019,1:43-47.

თეზისები:

1. T. Kvaratskhelia, L. Tsiklauri. Biopharmaceutical parameters to consider in order to change the fate of nanocarriers in oral delivery. 5-th International Conference of Young Scientists (Chemistry Today-2016). September 18-21, Tbilisi, Georgia. 2016. 52-53.
2. L. Tsiklauri, T. Kvaratskhelia, L. Slovák, K. Bauerova, M. Alaniya. Anti-inflammatory effect of robinin evaluated in a model of arthritis induced in rats. Third scientific conference in Natural and synthetic biologically active compounds Tbilisi: Georgian National Academy of Sciences, 2016, p. 184-185
3. თ. კვარაცხელია, ლ. წიკლაური. ფლავონოიდ გლიკოზიდის რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდის ოპტიმიზაცია ბიოლოგიურ სიტხეებში. ახალგაზრდა მეცნიერთა მე-2-ე კონფერენცია მიძღვნილი საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის 75 წლისთავისადმი. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემია. ახალგაზრდა მეცნიერთა საბჭო. ახალგაზრდა მეცნიერთა განვითარების ფონდი. თებერვალი 26-28, ბაკურიანი, საქართველო. 2016 წ, 67-68 (ორალური პრეზენტაცია).
4. T.Kvaratskhelia, L. Tsiklauri. Nanotechnology-based drug delivery systems for flavonoids: An Opportunity to Increase Oral Bioavailability and Bioefficacy. ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის ახალგაზრდა მეცნიერთა საბჭო. მაისი 18-19, თბილისი, საქართველო. 2015 წ, 75-76.
5. თ. კვარაცხელია. ფენოლური ნაერთების ბიომეღწევადობა და მეტაბოლიზმი. ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის ახალგაზრდა მეცნიერთა საბჭო. მაისი 18-19, თბილისი, საქართველო. 2015 წ, 88-89 (ორალური პრეზენტაცია).



St. Andrew the First-Called Georgian University of the
Patriarchate of Georgia

On the rights of manuscript

School (Department) of Business, Computing and Social Sciences

Educational Program - Chemistry of biologically active substances and medicinal
expertise

Tamar Kvaratskhelia

**Development of effective dosage form for nephroprotective
bioflavonoids**

Abstract

05 natural sciences

Tbilisi
2019

The research work was performed at the pharmaceutical factory -"Iveriapharma" in the research laboratory and at the school(Department) Business, Computing and Social Sciences of the St. Andrew the first-called Scientific University of the Georgian Patriarchate.

Scientific Supervisor: **Lia Tsiklauri**
Academic Doctor of Pharmaceutical Sciences

Official Opponents: **Nugzar Aleksidze**
Doctor of Biology, Professor

Alexander Skhirtladze
Academic Doctor of Pharmaceutical Sciences

Defence of the thesis will be held on “ _____ ” 2019

At St. Andrew the first-called Scientific University of the Georgian Patriarchate, School (Department) Business, Computing and Social Sciences, at the meeting of dissertation committee of Schools (Departments)

Adress: 0162, Tbilisi, № 53a Ilia Chavchvadze Ave., building II, Saint Ilia Martali Conference Hall

Dissertation text is available at St. Andrew the first-called Scientific University of the Georgian Patriarchate.

The abstract of the thesis is sent on “ _____ ” 2019

Secretary of Dissertation Council,
Nino Damenia, Academic Doctor of Business Management, Associate Professor

General characterization of the work

Relevance of the topic - Flavonoids are large class of biologically active natural substances widely distributed in the plant kingdom and characterized by various pharmacological effectiveness, such as: anti-inflammatory, hepatoprotective, nephroprotective, antiallergic, thrombolytic, antiviral, anti-carcinogenic and others. In recent decades, the interest in flavonoids has greatly increased due to their high antioxidant activity.

At the same time, when taken orally, the bioavailability of these compounds is low and consequently their therapeutic effect is restricted. Incomplete absorption of flavonoids is due to their poor ability to penetrate the cell lipid membrane; because of high molecular weight, they are poorly absorbed and therefore biological efficiency is low. The aim of our research is improvement of this condition by increasing the bioavailability of flavonoids in order to increase their effectiveness. In particular, for the expression of nephroprotective properties of flavonoid glycoside -Kaempferol-3-O-robinoside-7-O-rhamnoside(KRR), it is important to develop effective drug delivery system and increase bioavailability. An innovative way of solving such problems is the use of nanotechnologies in the pharmaceutical industry.

In drug delivery technologies, nanocarriers are designed to protect a drug from in vivo degradation; enhance drug absorption by facilitating diffusion through epithelium; modify pharmacokinetics and drug tissue distribution profile; improve intracellular penetration and subcellular distribution. Furthermore, surface modification of pharmaceutical nanocarriers is used to control the movement of drug throughout the body. The most important results of such modification include an increased stability and half-life of nanocarriers in the blood circulation, passive or active targeting into the required pathological zone and responsiveness to local stimuli such as pathology associated changes in local pH and/or temperature.

The aim of the research. Investigation of bioavailability of nephroprotective flavonoid and selection of optimal drug delivery system on the bases of complex studies, such as technological, physical-chemical, chemical and biopharmaceutical.

To achieve this goals following tasks were set:

- Investigation the rheological and technological properties of KRR.
- Development quantitative analysis method for KRR in biological fluids.
- Stability study of KRR.
- Evaluation of intestinal permeability of KRR using human colon adenocarcinomic cells (Caco-2) as an intestinal barrier model.

- Evaluation typical P-gp-involved transport properties.
- Investigation the influence of mucoadhesive polymers on KRR intestinal absorption.

Scientific novelty of the work. The rheological and technological properties of nephroprotective bioflavonoid were investigated. According to the obtained data KRR exhibits multimodal size distribution and poor flowability, that requires a critical approach to ingredient selection and suitable drug delivery system development.

A simple, specific and sufficiently sensitive HPLC method was developed to analyse KRR in biological fluids. The method was validated according related parameters. The lower limit of detection (LOD) was 10 ng/mL.

The stability of KRR in tested mediums was evaluated in the presence and absence of ascorbic acid. It was established that compound is stable during the experiments and ascorbic acid had no significant effect on its stability.

The permeation ability of KRR across Caco-2 cells was investigated. The obtained results suggested that tested compound has typical P-gp-involved transport properties including preferential transport in the basolateral to apical direction. The mean apparent permeability coefficient (P_{app}) of KRR in the absorptive direction was 2.14 fold higher than in the secretory direction. The co-presence of P-gp inhibitor substantially reduced the basolateral to apical efflux of KRR and 1.6 fold increased.

The influence of mucoadhesive biodegradable polymers on bioavailability of tested compound was evaluated in Caco-2 cells. 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 2.79 fold decreased than pure KRR. Contrariwise, the glutathione and Polyacrylic acid - glutathione showed no significant effect at all.

The obtained data demonstrated that glutathione modified chitosan may be used for improvement the permeability of orally injected KRR across small intestine.

Theoretical and methodological basis of the research. High-performance liquid chromatography(HPLC) is used for quantitative analysis of tested compounds. HPLC is a technique used to separate, identify and quantify each component in a mixture on the basis of their molecular structure and molecular composition.

The granulometric analyses of tested compound was performed by standard sieve Retsch VE1000 (Haan, Germany) and laser diffraction analyzer (LS 100 Q Instrument (Beckman Coulter Particle Characterization) according to the European Pharmacopoeia 8.

The powder rheological parameters was determined by tap tester (tapping machine (J. Englesman, Ludwigshafen, Germany) and Powder Flow Tester (FT 300) according to methods discribed in European Pharmacopeia 8.

The bioavailability was evaluated In vitro experiments using human colon adenocarcinoma cell lines (Caco-2). Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured to determine the integrity of tight junction in cells.

The ststistical analyses were performed according to the student's test. P-values <0.005 were considered to indicate statistically significant differences. All data are expressed as the means \pm SD of the results of 3 experiments.

Practical value of the work. The bioavailability of KRR was investigated using biopharmaceutical studies in the human intestinal Caco-2 cells.

It is established that KRR has typical P-gp involved transport proprties, that reduces its orall bioavailability.

On the basis of obtaines data, the mucoadhesive drug delivery system and suitable polymers were selected. The initialformulation of mucodhesive tablets has been developed

The structure and volume of the work . The thesis is comprised by: annotation (in Georgian and English), introduction, literature review; experimental section describing tested materials, research methods, results of own experiments and their discussion, conclusions; the list of used literature where 109 sources are indicated. The work is illustrated with 7 tables, 15 schemes and 43 pictures. The volume of the thesis is 109 pages.

The basic content of the work

Materials: Kaempferol 3-robinoside 7- rhamnoside (KRR). CAS N: 301-19-9. obtained fromplant leaves Robinia pseudoacacia L. Chitosan CAS N: 9012-76-4- (medium molecular mass: 400 kDa; degree of deacetylation: 83-85%); L- glutathione reduced form(GSH), CAS N: 70-18-8; MW: 307.32, Poly(acrylic acid) (PAA) - CAS N 9003-01-4; MW: 1800; fetal calfserum (FCS) (NR. 26140-079); N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), minimum essential medium (MEM) and other chemicalsand solvents were obtained from Sigma. All chemicals were of analytical grade.

Investigation of Technological Properties of nephroprotective bioflavonoid. Properties of the active pharmaceutical ingredients are the primary driver of the technology choice. Knowledge of the API technological characteristicsis essential for successful dosage form design and development. The aim of the present study was to investigate technological properties, such as particle size and distribution,

tap and bulk densities, angle of repose (AOR) and flowability of nephroprotective KRR.

The particle size analyses were performed by standard sieve and laser diffraction analyzer. According to the obtained data (Figure 1. A, B) tasted sample mainly contains (72.69%) particles ranging in size between 140-250 μm ; the particle's narrow distribution range ($\sigma\sigma = 1.70$) indicates the homogeneity of powder. The main parameters: $D_{10} = 6.76\mu\text{m}$, $D_{50} = 90.51\mu\text{m}$, $D_{90} = 240.7\mu\text{m}$ and the Sauter mean diameter $D(3, 2) = 18.19$, were defined for the tested powder.

As shown in Figure 2.1 B, KRR exhibits multimodal size distribution with the higher peak around 100-250 μm (modal diameter is 116.03 μm) and the lower peak around 700 - 800 μm ; the presence of the lower peak may be a result of the observed agglomerated particles in the system; and the low values of width and height of this peak verify the homogeneity of tested substance. The deviations between the values obtained by sieve analysis and laser diffraction are due to the different measurements obtained with each method.

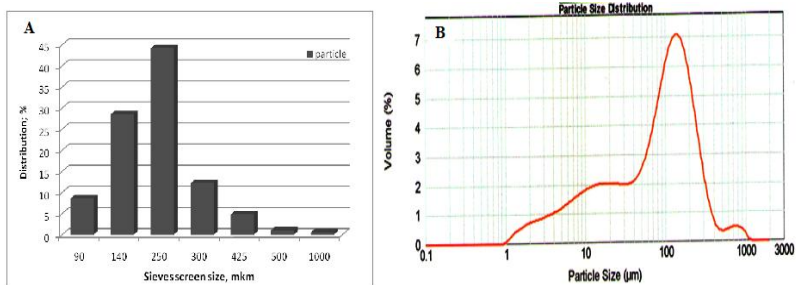


Figure 1. Particle size distribution of KRR determined by standard test sieves (A) and laser light diffractometry (B). $n=3$; \pm SD.

The particle shape, size and variation in size affect on the flowability of powders. Carr's index and Hausner ratio are the simple and fast method for predicting flowability properties of powders. These two commonly used indexes are calculated from the bulk and tapped densities. The Hausner Index ($\rho_{\text{max}}/\rho_{\text{min}}$) values above 1.25 demonstrate poor flow, while lesser values are associated with moderate to excellent flow. Carr Index ($[(\rho_{\text{max}} - \rho_{\text{min}}) / \rho_{\text{max}}]100\%$) values above 20% indicate poor flow while values less than 15% indicate excellent flow.

The Angle of Repose (AOR) is a measure of powder cohesiveness and is a popular determination as it is an easy method to indicate powder flowability. Most free-flowing materials have angles of less than 50 $^{\circ}$. However, these indexes alone do not adequately assess powder flowability.

Development of analyses method for quantification KRR in biological fluids.

To assess the bioavailability of nephroprotective bioflavonoid the quantitative determination method in biological fluids has been developed. Considering the physico-chemical properties of tested compound Fisetin was chosen as an internal standard.

In order to optimize mass spectrum parameters, the standard solutions of KRR and Fisetin was prepared in methanol/aqueous solution (50:50, v/v). The analysis was carried out on an Applied Biosystem API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometer (Applied Biosystem, Foster City, CA); chromatographic separation was achieved using XTerra MS C18 column (2.1×100mm i.d., 3.5 μ m; Waters Corporation, USA). The precursor ions ([M-H]⁻) for KRR and its internal standard - fisetin were observed at m/z 739.2 and 285.2 respectively. The fragment ions had a m/z ratio of 593 for KRR, and 135.1 for fisetin (Figure 3,4).

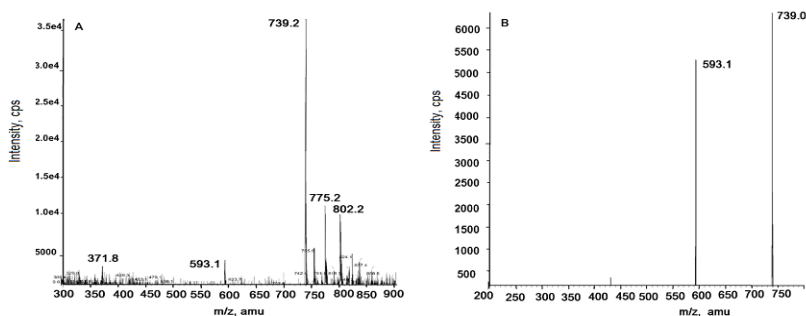


Figure 3. Q1 full scan (A) and product ion scan (B) mass spectra of KRR.

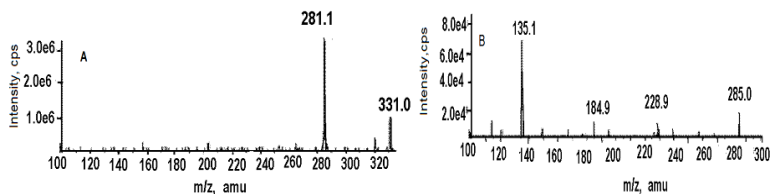


Figure 3. Q1 full scan (A) and product ion scan (B) mass spectra of fisetin.

The analysis were carried out on Waters HPLC system (Milford, MA, USA). The optimal separation of tested compound from internal standard (IS) was achieved using a reverse phase column Platinum EPS C-18 (250×4,6 mm i.d., 5 μ m, purchased from Alltech Associates, Inc.) characterising by wide range of selectivity.

For the selection of mobile phase the mixture of tetrahydrofuran-methanol-isopropanol with various buffer solutions, as well as aqueous solution of acetonitrile were investigated. Good separation was achieved using the mobile

phase consisted of solvents A: 5% methanol in phosphate buffer (pH 2.0; 0.01 M) and B: tetrahydrofuran–isopropanol–methanol–water (150:200:67.5:32.5 v/v/v/v) at the ratio of 60:40 (A: B); The mobile phase was delivered isocratically with a flow rate of 1.0 ml/min; the analysis run time was 15 minute. The mobile phase was passed under vacuum through a 0,45µm membrane filter and degassed before use. Under these conditions, the retention time of KRR and fisetin was 3.54 and 6.45 min respectively (Fig.5).

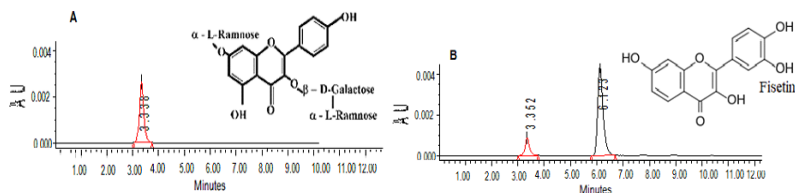


Figure 5. Chromatograms of KRR(A) and fisetin (B) at the concentration of 1 µg/ml in mobile phase.

For the optimisation of method for quantification KRR in biological fluids in experiments were used Caco 2 cell lysates. Individual stock solutions of 1mg/ml of tested compound and 0.25 mg/ml of fisetin were prepared in DMSO. The standard work solutions were made by diluting of stock solutions with methanol. To prepare calibration curves, samples of KRR were added to blank cell lyses solution to give final concentrations of 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml. For evaluation accuracy and precision three concentrations (50, 100, 500 ng/ml) of the test compound were prepared. The assays were performed three times on the same day for intra-day and on five separate days for inter-day (n=3) accuracy and precision.

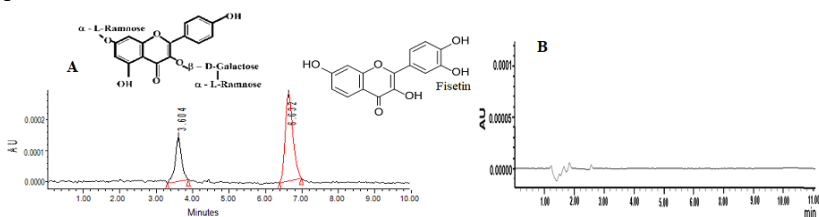


Figure 6. Chromatograms of 50 ng/ml KRR and 20 ng/ml fisetin accumulated in Caco-2 cells (A); Typical chromatogram of extract of blank Caco-2 cell lysis solution(B).

Prior to analysis, the equal volume of methanol was added to samples and briefly vortex-mixed for precipitating proteins. After vigorous vortexing, the samples were centrifuged for 10 min with 13,000 rpm at 4°C. The supernatant was transferred into another test tube and added double volume of methanol, IS

and evaporated to dryness with nitrogen. The residue was reconstituted in 100 μ l mobile phase and aliquot of resulting solution was injected into the HPLC system. There were no interfering peaks co-eluting with the compounds of interest and a good separation of flavonoids was achieved under this chromatographic condition (Fig.6).

Calibration curves for KRR (IS fisetin), constructed by plotting the analyte / internal standard peak area ratio against analyte concentration were linear over the concentration range of 25 to 1000 ng/ml (Fig. 7). The regression equation of calibration curves was $y = 0.008x - 0.011$. The correlation coefficient was found to be quite high ($R^2 = 0.999$), which shows that the method is capable of producing good response in UV-detector.

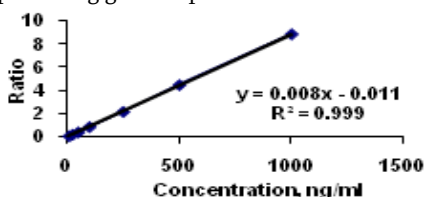


Figure 7. Calibration curve for the HPLC analysis of KRR (IS fisetin) in cell lysis solution. $n=3$; \pm SD.

The accuracy of developed method was evaluated by the results of analyses of quality control samples in cell lysates at three concentrations. The measurement was performed in triplicate. The obtained data are presented in Table 2. The mean recovery value obtained on the same day by repeated analysis was 102.1%; the intraday accuracy was within 98.4 -104.6%. These results show that developed HPLC method exhibits satisfactory accuracy.

Table 2 Method validation results

Analyte	Target concentration (μ g/ml)	Intra-day assay			Inter-day assay		
		Measured concentration (μ g/ml)	Accuracy*, %	Precision, %	Measured concentration (μ g/ml)	Accuracy*, %	Precision, %
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

* -mean of triplicate determinations

The relative standard deviation (R.S.D.), which was used for the evaluation of precision, were below 5 for intra-day, and below 9 for inter-day repeatability for KRR respectively. The low values of RSD indicate the repeatability and

reproducibility of the method. The limit of detection (LOD), defined as the lowest sample concentration which can be detected ($S/N = 10$) was 10 ng/ml.

Extraction efficiency from cell lysis solution was evaluated ($n=3$) at three concentrations (50, 100, 500 ng/ml) by comparing the peak areas of an extracted samples containing a known amount of KRR with the peak areas obtained from direct injections of the solution containing the same concentration of compound in mobile phase. Amount of compound, discovered in mobile phase was taken for 100 per cent (Fig. 5). Mean extraction efficiency for tested compound varied from 61 to 70%.

The stability of KRR was evaluated in the presence or absence of ascorbic acid in mobile phase and HEPES medium. It was established that KRR is stable during the storage in different conditions and ascorbic acid had no significant effect on stability of tested compound. The re-appearance range of KRR stored at -20 and 20°C was 76.9 - 97 % and 97.7-102.2 % respectively for 50 and 100 ng/ml concentrations (Figure 8). In HEPES medium re-appearance range of tested compound was 97.64-99.1% and 98.67-98.82% in the absence or presence of ascorbic acid.

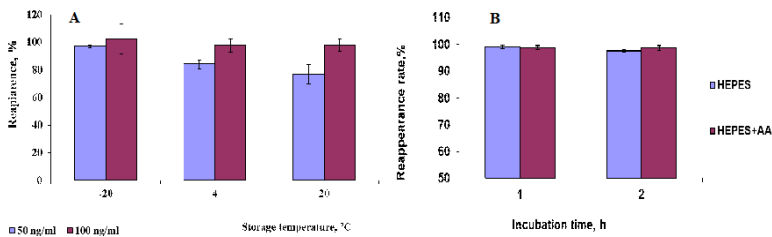


Figure 8. Influence of storage temperature and HEPES medium on stability of KRR. $n=3$; \pm SD.

In-vitro evaluation of KRR bioavailability. Next aim of our investigations was to determine intestinal permeability of nephroprotective KRR using human colon adenocarcinoma cell lines (Caco-2) as a model of the intestinal barrier. Caco-2 cells have been of great utility in intestinal absorption studies due to their exclusive capability to model human absorption properties and expressing several morphological and functional characteristics of the mature enterocyte.

Prior to use Caco-2 cells in the transport experiments P-gp over expression was confirmed by Western blotting analysis (Figure 9 A); MCF-7/sensitive and MCF-7/ADR cells were used as P-gp negative and positive control.

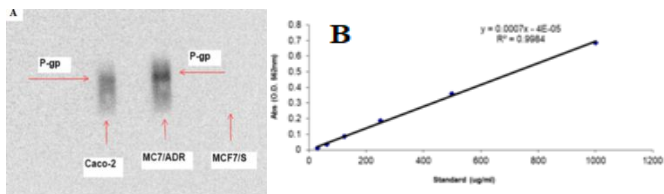


Figure 9. P-gp expression in MCF-7/sensitive, MCF-7/ADR and Caco-2 cells by Western blotting (A); calibration curve (B).

The immunoblotted samples were quantified by standard curve. The calibration curve was linear up to 1500 µg / ml concentration of standard; all samples were diluted in the above mentioned range (Figure 9.B).

Permeation studies were performed with Caco-2 cell monolayers cultured for 24 days. Caco-2 cell monolayers with TEER values in the range of 500 to 600 Ω cm² were used for permeation studies. Bidirectional transport experiments, ie, apical→basolateral and basolateral→apical, were conducted in triplicate at the concentration 20 µg/mL for tested compound.

The transport experiments were performed by replacing MEM medium on both sides with HEPES buffer adjusted to pH 6.8. Investigational compound solution was added to the donor side for absorptive (AP to BL) and receiver side for basolateral (BL to AP) transport. TEER was measured every hour and samples of 200 µL were taken every hour from the acceptor compartment and replaced by transport medium. After completion of the permeation studies Caco-2 cell monolayers were allowed to regenerate for 24 h in the CO₂-incubator.

The samples were centrifuged at 15000 g for 5 min at room temperature and 50 µL of supernatant was subjected to HPLC. Inhibition of KRR transport was tested with known P-gp inhibitor Verapamil (100 µM) applied in either the apical or basolateral chamber. Unidirectional and net flux of KRR was measured in the presence and absence of Verapamil.

The apparent permeability coefficient, P_{app} , expressed in cm/s was calculated according to the following equation: $P_{app} = (\Delta Q / \Delta t) / (A \times C_0)$; where $\Delta Q / \Delta t$ is the permeability rate (µg/s) of the investigational compound, A is the surface area of the cell monolayer (cm²), and C_0 is the initial concentration in the donor chamber (µg /mL). Percent transport was calculated as the ratio of permeated KRR in the receiver chamber to the initial concentration in the donor chamber X 100. Transport was monitored for a period of 3 h.

In experiments KRR demonstrated bidirectional transport (Figure 10); BL-to-AP flux for tested compound was found to be significantly higher than AP-to-BL; the mean apparent permeability coefficients (P_{app}) of KRR in the absorptive direction was 2.14±0.61 fold higher ($P_{ratio} > 2$) than in the secretory direction. P-

gp efflux resulted in higher BL to AP transport than AP to BL transport. The co-presence of P-gp inhibitor substantially reduced the basolateral to apical efflux of KRR and significantly increased (1.6 fold) the AB-BL flux, thus provided supportive evidence for the involvement of an ATP-dependent active mechanism for intestinal transport of this compound.

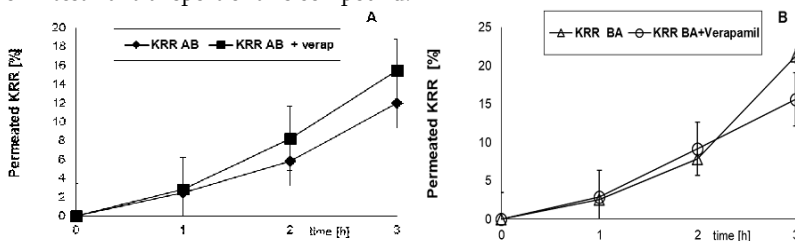


Figure 10. Trans epithelial transport of KRR across Caco-2 cells in the absorptive (A) and secretory directions (B) in the presence or absence of Verapamil. n=3; ± SD.

Bioavailability enhancement of KRR using biodegradable polymeric materials.

The aim of the present study was to investigate the effect of mucoadhesive polymers on intestinal permeability of KRR. Considering the biopharmaceutical properties of tested compound the following polymers were selected: chitosan (CH), reduced glutathione (GSH), chitosan-glutathione (CH-GSH) and polyacrylic acid - glutathione (PAA-GSH) conjugates. In the experiments were used Caco-2 cell monolayer with TEER values in the range of 500 - 600 Ω cm². Bidirectional transport experiments, ie, apical→basolateral and basolateral→apical, were conducted in triplicate at the concentration 20 μ g/mL for tested compound. The transport experiments were performed by replacing the medium on both sides with HEPES buffer containing GSH, CH-GSH or PAA-GSH, and the tested compound. TEER was measured every hour and samples were taken every hour from the acceptor compartment and replaced by fresh buffer. The amount of permeated tested compound was analysed by HPLC method. According to the obtained data free glutathione and poly(acrylic acid)-glutathione conjugate have no significant influence on transfer efficiency of KRR from the apical to basolateral side comparing to KRR alone (Figure 11. A). The glutathione modified chitosan showed an increased permeation-enhancing effect on KRR in comparison to free tested compound; the transport profile of KRR was increased 1.36-fold compared to pure KRR.

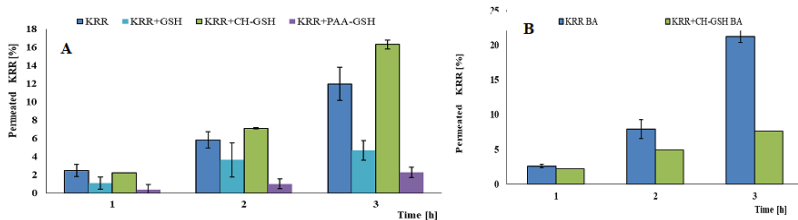


Figure 11. Effect of polymers on the absorptive transport (A) and influence of CH-GSH on the basolateral transport of KRR across Caco-2 cell monolayer. n=3; \pm SD.

The investigations on influence of modified chitosan on basolateral transport of tested compound showed that (Fig. 11.B) the basolateral to apical efflux of KRR in combination of CH-GSH was found to be significantly lower than pure KRR; the mean apparent permeability coefficients (P_{app}) of KRR in the presence of glutathione modified chitosan in the absorptive direction was 2.79 ± 0.91 fold lower than of KRR alone. These data suggests that chitosan-glutathione conjugates could promote tested flavonoid transport across the Caco-2 cell monolayer.

The reversible effects of free tested compound and its combination with different polymers on the barrier properties and opening the intestinal tight junctions are presented in Figure 12. As can be seen, the drop in TEER appears after apical application of samples. A decrease in TEER is an indicator of barrier disruption, which diminishes the epithelium's capacity to prevent uncontrolled passage of molecules. 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.

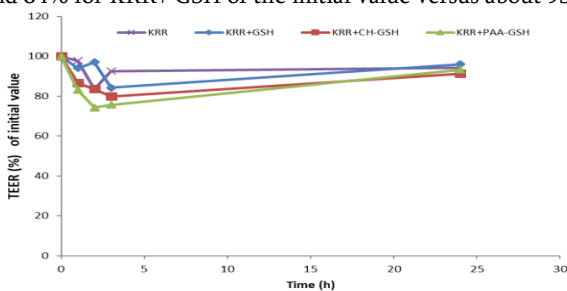


Figure 12. Effects of KRR, KRR+GSH, KRR+CH-GSH and KRR+PAA-GSH on TEER of Caco-2 cell monolayer. n=3; \pm SD.

It should be noticed that a time dependent decrease of the TEER under the influence of combination KRR with CH-GSH, followed by an increase of KRR transport, indicating a loosening of the tightness of intercellular junctions, i.e. the opening of the paracellular route across the epithelium for normally low-absorbable compounds. The loss of epithelial barrier function is paralleled by a loss of cellular polarization and differentiation, but the cells are obviously not irreversibly damaged and are still capable to redifferentiate after 24 hours.

The next aim of this study was to develop gastrointestinal patch systems on the bases of selected biopolymer and compare its bioavailability with control tablets containing tested compound. In this regard two samples of KRR comprising mucoadhesive systems F 1 and F 2 were investigated. In F 1 – formulation active ingredient was dissolved in minimal amount of DMSO, while in F 2 formulation was dissolved in minimal amount of ethanol. Prepared mucoadhesive tablets were composed by the matrix (20 mg) with KRR (25%), Lyophilized CH-GSH (70%) and GSH (5%) and separation layer - granulate (42% of tablets weight). Pressure of 8 kN was kept constant during the preparation of all tablets. The obtained flat-faced tablets diameter was 5.0 mm and height – 1 mm. Thereafter, all tablets were enteric coated with Eudragit L100 (Germany).

The bioavailability studies were performed using Caco-2 cell monolayers described above. The transport experiments were performed by replacing the medium on both sides with HEPES buffer containing KRR or mucoadhesive systems in presence of free GSH. According to the obtained data Ch-GSH in combination with unbound GSH in formulations F1 and F2 caused respectively a 1.66 and 1.32 -fold higher basolateral and 2.78 and 1.65-fold decreased apical transport of KRR in comparison to KRR alone. TEER was measured during and after permeation studies with Caco-2 cell monolayers to ensure integrity of the membrane. 4-5 h after treatment TEER nearly recovered completely and after 24 h TEER of all membranes recovered full.

Mucoadhesion is directly associated with swelling behaviour. The swelling behaviour of mucoadhesive polymers has considerable influence on their adhesive properties and cohesiveness. The water-absorbing capacity was determined by a gravimetric method. Test tablets were incubated in a 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 at 37°C. At scheduled time intervals the hydrated test tablets were taken out of the incubation medium, excess water was removed and the amount of water uptake was determined gravimetrically on a balance. The weight from patch systems after 90 min with Ch-GSH increased to about 137.14% and the weight from uncoated tablets containing only KRR increased to about 428.57%. At the end of the experiment, no erosion or dissolving of the tablets and the patch systems was observed. The slow swelling process favours the high cohesive properties of the conjugate.

The release rate of KRR from patch systems (F1) was analysed in vitro (US Pharmacopoeia). The studies showed that tested compound was released from patches over a period longer than 8 h; during the first 2 h no release of KRR was observed. After changing the pH 59.78 \pm 0.82% of KRR was released within 6 h. The release behaviour of the patches could be explained with their designed constitution as drug delivery system and using the Ch-GSH as a carrier of the primary matrix. The polymer matrix probably combines two major types' of mechanisms for drug release: controlled diffusion and swelling. Considering all above mentioned, it can be concluded, that mucoadhesive systems of drug delivery could be successfully used for effective absorption of KRR.

Conclusions

1. The granulometric properties of nephroprotective bioflavonoid were investigated. According to the obtained data KRR exhibits multimodal size distribution and mainly contains (72.69%) particles ranging in size between 140-250 μ m; the particle's narrow distribution range ($\sigma_g = 1.70$) indicates the homogeneity of powder; $D_{10} = 6.76\mu\text{m}$, $D_{50} = 90.51\mu\text{m}$, $D_{90} = 240.7\mu\text{m}$ and the Sauter mean diameter $D(3, 2) = 18.19$ were defined also for the tested powder.
2. The rheological properties of KRR were evaluated. It was determined that KRR possess poor flowability: AOR =58.10; $I_c = 27.31\%$, HR =1.38, $\alpha'/\alpha_{ref} = 0.37$.
3. A simple, specific and sufficiently sensitive HPLC method was developed to analyse KRR in biological fluids. The method was validated: the intra day accuracy and precision were 102.1%, R.S.D <5 and the inter-day accuracy and precision were in the range of -98.4 - 104.6%, R.S.D <9. The lower limit of detection (LOD) was 10 ng/mL.
4. The permeation ability of KRR across Caco-2 cells was investigated. The obtained results suggested that tested compound has typical P-gp-involved transport properties including preferential transport in the basolateral to apical direction.
5. The influence of biodegradable polymers on bioavailability of tested compound was evaluated. 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.

6. The obtained results from in vitro experiments showed the reversible effects of KRR alone and in co-presence of polymers on barrier properties of intestine.
7. The obtained data demonstrated that glutathione modified chitosan may be used for improving the permeability of KRR across small intestine.

List of publications related to the dissertation topic

Articles:

1. 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.
2. 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.
3. Kvaratskhelia T., Tsiklauri L. Bioavailability enhancement of bioflavonoid using biodegradable polymeric materials. Scientific-practical journal: Experimental & Clinical Medicine, 2019,1:43-47.

Abstracts:

1. T. Kvaratskhelia, L. Tsiklauri. Biopharmaceutical parameters to consider in order to change the fate of nanocarriers in oral delivery. 5-th International Conference of Young Scientists (Chemistry Today-2016). September 18-21, Tbilisi, Georgia. 2016, 52-53.
2. L. Tsiklauri, T. Kvaratskhelia, L. Slovák, K. Baueroва, M. Alaniya. Anti-inflammatory effect of robinin evaluated in a model of arthritis induced in rats. Third scientific conference in Natural and synthetic biologically active compounds Tbilisi: Georgian National Academy of Sciences, 2016, 184-185.
3. თ. კვარაცხელია, ლ. წიკლაური. ფლავონოიდ გლიკოზიდის რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდის ოპტიმიზაცია ბიოლოგიურ სითხეებში. ახალგაზრდა მეცნიერთა მე-2-ე კონფერენცია მიმდევნილი საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის 75 წლისთავისადმი. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემია. ახალგაზრდა მეცნიერთა საბჭო. ახალგაზრდა მეცნიერთა განვითარების ფონდი. თებერვალი 26-28, ბაკურიანი, საქართველო. 2016 წ, 67-68. (ორალური პრეზენტაცია).

4. T.Kvaratskhelia, L. Tsiklauri. Nanotechnology-based drug delivery systems for flavonoids: An Opportunity to Increase Oral Bioavailability and Bioefficacy. ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის ახალგაზრდა მეცნიერთა საბჭო. მაისი 18-19, თბილისი, საქართველო. 2015 წ, 75-76.
5. თ. კვარაცხელია. ფენოლური ნაერთების ბიომედიკინა და მეტაბოლიზმი. ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის ახალგაზრდა მეცნიერთა საბჭო. მაისი 18-19, თბილისი, საქართველო. 2015 წ, 88-89 (ორალური პრეზენტაცია).