

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ხათუნა ბეჟანიშვილი

ბიოდეგრადირებადი მიკროკაფსულების შექმნა ყურძნის წიპწის ზეთის  
ინკაფსულირების მიზნით და მისი ანტიოქსიდაციური  
ეფექტურობის კვლევა

სადოქტორო პროგრამა - ქიმიური და ბიოლოგიური ინჟინერია

შიფრი - 0711

დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარდგენილი დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი

2023 წელი

სამუშაო შესრულებულია საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ქიმიური ტექნოლოგიისა და მეტალურგიის ფაკულტეტის ქიმიური და ბიოლოგიური ტექნოლოგიების დეპარტამენტში; სსიპ ივანე ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის ძილ-ღვიძილის ციკლის ნეირობიოლოგიის ლაბორატორიაში

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

პროფესორი  
თეიმურაზ ბუაჩიძე

ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორი  
ნარგიზ ნაჭყებია

რეცენზენტები:

-----  
-----

დაცვა შედგება --2023----- წლის ”-----” -----, ----- საათზე

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ქიმიური ტექნოლოგიისა და მეტალურგიის ფაკულტეტის სადისერტაციო ნაშრომის დაცვის კოლეგიის სხდომაზე,

კორპუსი -----, აუდიტორია -----  
მისამართი: 0160, თბილისი, კოსტავას 77.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება სტუ-ის ბიბლიოთეკაში,

ხოლო ავტორეფერატისა – ფაკულტეტის ვებგვერდზე

ფაკულტეტის სწავლული მდივანი -----

## ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა. აუტიზმის სპექტრის დაავადება (ასდ) ბავშვთა ადრეული ნეიროგანვითარების დარღვევაა, რომელსაც მსოფლიოში და მათ შორის საქართველოში, ფართო გავრცელება აქვს. ბოლო წლებში ასდ-ს შემთხვევათა მკვეთრი ზრდა აღინიშნება. დაავადების კლინიკური სიმპტომატოლოგიის ჰეტეროგენური სპექტრი სირთულის სამ სხვადასხვა დონეს მოიცავს. ყველაზე რთული მესამე დონეა, რომელსაც ახასიათებს: სოციალური ურთიერთკავშირების დარღვევა; ვერბალური და არავერბალური კომუნიკაციის უნარების მნიშვნელოვანი დეფიციტი; უკიდურესად შემოფარგლული ინიციატივები; შფოთვა, ფიქსირებული რიტუალები და განმეორებითი ქცევები.

ასდ ბავშვების და მოზარდების ერთ-ერთ სერიოზულ პრობლემას ძილის დარღვევები წარმოადგენს. ეპიდემიოლოგიური კვლევების თანახმად, ძილის პრობლემების გავრცელება, ასდ ბავშვებში, დიაგნოზირებული შემთხვევების 44%-83%-მდე მერყეობს, რაც სხვადასხვა გამოვლინებებით იჩენს თავს. ძილის დარღვევებს გავლენა აქვს ემოციების რეგულაციის უნარზე, მომატებული აგრესია, შიშის და შფოთვის გაძლიერება, შეიძლება ძილის დარღვევების გამო ვითარდებოდეს. ამიტომ, ძილის დარღვევები იმ ყველაზე მეტად ურგენტულ პრობლემებს შორისაა, რომელთაც ასდ ბავშვების ოჯახები ებრძვიან, თუმცა, ეს სფერო, დღემდე, ერთ-ერთ ყველაზე ნაკლებად შესწავლილ ასპექტად რჩება.

გამოკვლევების ჩატარება, კლინიკურ გარემოში, ძალიან რთულია, ვინაიდან, ასდ ბავშვებს და მოზარდებს უცხო გარემოსთან ადაპტაციის და კომუნიკაციის დიდი სირთულები აქვთ, რაც მათ ჩართვას კონკრეტულ კვლევებში, თითქმის, შეუძლებელს ხდის. ამიტომ, მთელ მსოფლიოში, აქტუალური გახდა ამ დაავადების ცხოველური მოდელების გამოყვანა, მათზე ჩატარებული კვლევების შედეგების ასდ ინდივიდებზე შემდგომი ექსტრაპოლაციის მიზნით.

წარმოდგენილი ნაშრომის ერთ-ერთი აქტუალობაც იმაშია, რომ ასდ-ს ცხოველური მოდელებია გამოყვანილი, და ყურძნის წიპწის ზეთის (ყწზ) ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის დასადასტურებლად, მათზეა კონკრეტული კვლევები ჩატარებული.

ჩვენი ინტერესი ყწზ-ის ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის კვლევის მიმართულებით რამოდენიმე გარემოებით არის მოტივირებული: 1. ძლიერი მტკიცებულება, რომ ოქსიდაციური სტრესი შეიძლება იყოს ძირითადი კონტრიბუტორი ასდ-ს განვითარებაში, როგორც ბავშვებში, ისე აუტიზმის ცხოველურ მოდელებში; 2. დაჟანგულმა ცილებმა და ლიპიდურმა პეროქსიდაციამ, რომლებიც რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების დაგროვებით არის გამოწვეული, შეიძლება გამოიწვიოს ნეიროანთება და უჯრედების სიკვდილი, რასაც ნეირონების დეგენერაცია და პათოლოგიური მდგომარეობის განვითარება მოჰყვება.

პრობლემა აქტუალურია, ვინაიდან, ზოგადად ზეთების და კერძოდ, ყწზ-ის ინკაფსულირება მათი პრეკლინიკურ ექსპერიმენტულ კვლევებში გამოყენების ერთადერთი საშუალებაა, სადაც სალი და ხარისხიანი პროდუქტის დოზირებულ, კონტროლირებად მიწოდებას ძალიან დიდი მნიშვნელობა აქვს.

წამლების და/ან ზეთების ინკაფსულირება 21-ე საუკუნის ინოვაციური მიდგომაა მათი უსაფრთხო მიწოდებისთვის, სადაც განსაკუთრებული მნიშვნელობა მათ მატარებლებს, ანუ კედლის მასალას ენიჭება. დღემდე არსებულმა მიკროკაფსულებმა, სადაც კედლის მასალად არაბული წებო ან მისი და მალტოდექსტრინების კომბინაცია გამოიყენებოდა, ვერ გადაჭრა არაბული წებოს გაზრდილი ფასების და მის მიწოდებაში არსებული რყევების პრობლემა და არც სხვა შემთხვევებისთვის აღმოჩნდა გამოსავალი, მაგ. ექსპერიმენტული კვლევების წარმოებისას ცხოველურ მოდელებში, სადაც, აუცილებელია დოზირებული, კონტროლირებადი მიწოდება და მიკროკაფსულის კედლის შემადგენლობას და ზომებს დიდი მნიშვნელობა ენიჭება.

ჩვენი ყურადღება, ამ მხრივ, ბიოდეგრადირებად ფსევდოპროტეინებზე იქნა აქცენტირებული, ვინაიდან აღნიშნული ფსევდოპოლიმერები, ბიოდეგრადაციის შედეგად, ცილების მსგავსად, ბუნებრივ ამინომჟავებს გამოყოფენ და ხელს უწყობენ უჯრედების პროლიფერაციას, ქსოვილების რეგენერაციას, ამასთან ერთად, ბუნებრივი მაკრომოლეკულებისგან (ცილებისგან) განსხვავებული მოლეკულური არქიტექტურის გამო, დაბალი იმუნოგენურობა ახასიათებთ. ამ თვისებების გამო გადავწყვიტეთ პირველად მოგვეხდინა ყწზ-ის მიკროკაფსულირება კედლის მასალად ფსევდოპროტეინებზე დაფუძნებული

ბიოდეგრადირებადი მასალის გამოყენებით და შეგვესწავლა მისი ანტიოქსიდაციური ეფექტურობა პრეკლინიკურ პირობებში, აუტიზმის ცხოველურ მოდელებში.

ყწზ-ის გამოყენება, პრეკლინიკურ კვლევებში, საკვები დანამატის სახით, მთელ რიგ სირთულეებთან არის დაკავშირებული. სპეციალურ კვლევაში ნაჩვენებია, რომ სხვადასხვა ზეთების, და აგრეთვე ყწზ-ის, ინტრაპერიტონეალური ინექცია პერიტონეალურ ანთებას და რეზიდენტი პერიტონეალური მაკროფაგების განადგურებას იწვევს, რაც მნიშვნელოვანი გვერდითი ეფექტებია და ექსპერიმენტული კვლევების ჩატარებას შეუძლებელს ხდის. ამგვარი გართულებების აღმოფხვრის ერთ-ერთ გზად მიჩნეულ იქნა ზეთის დოზირებული ქრონიკული მიწოდება ცხოველებისთვის, სპეციალური ზონდის საშუალებით, რაც ჩვენი მიზნებისთვის, სრულად მიუღებელი აღმოჩნდა, რადგან, ზონდირებულ ცხოველებზე მოგვიწევდა ქცევითი და ძილის დარღვევების კვლევა, მაშინ, როდესაც ამ პროცედურამ თვითონ შეიძლება გამოიწვიოს ასეთი დარღვევები.

ამ სირთულეების დასაძლევად, ჩვენ მიერ, დაიგეგმა ყწზ-ის ინკაფსულირება და ამ მიზნით, სპეციალური, ბუნებრივი მასალის, ბიოდეგრადირებადი მიკროკაფსულების მიღება, ისეთი სახით და ზომებში, რაც საშუალებას მოგვცემდა საინექციო შპრიცის საშუალებით მოგვეხდინა მათი კონტროლირებადი დოზირებული შეყვანა მუცლის სისხლძარღვოვან წნულში (შიდაპერიტონეალურად) და აგრეთვე სადი პროდუქტის დოზირებული, უსაფრთხო დამატება ცხოველთა სპეციალურ საკვებში, შპრიცების საშუალებით.

კვლევები ორ ძირითად ასპექტზე იყო ორიენტირებული: 1. ყწზ-ის მიკროკაფსულირება, კედლის მასალად ბიოდეგრადირებადი ფსევდოპროტეინის გამოყენებით, და 2) მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის უსაფრთხო, კონტროლირებადი, დოზირებული მიწოდების შესაძლო ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის კვლევა აუტიზმის ცხოველურ მოდელებში. ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის შემოწმება ხდებოდა რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების შემცველობაზე სისხლის პლაზმაში, ძილის დარღვევებზე და ემოციური ქცევის ისეთ მნიშვნელოვან პათოლოგიაზე, როგორცაა შფოთვა. სამივე მათგანი ასდ ინდივიდების დამახასიათებელ სერიოზულ პრობლემას წარმოადგენს.

**მეცნიერული სიახლე.** სადოქტორო კვლევის ფარგლებში მიღებულია სრულიად ახალი, ბიოდეგრადირებად ფსევდოპროტეინ 8L6-ის კედლის მასალაში მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ემულსია, რომელიც პერსპექტიულია ასდ-ის პათოგენეზის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ფაქტორის, ანტიოქსიდაციური დისრეგულაციის პრევენციისთვის. ამ მიზნით დასინთეზებულია სამი სხვადასხვა ფსევდოპროტეინი (8L6-ის, 1L6-ის და 8L6-ისა და 1L6-ის თანაპოლიმერი) და ნაშრომში პირველად არის შესწავლილი: სხვადასხვა ფიზიკურ-ქიმიური ფაქტორების გავლენა ყწ-ის მიკროკაფსულირების რიგ მაჩვენებლებზე (ნაწილაკების ზომა, პოლიდიპერსიულობის ინდექსი და სხვა); ყწ-ის გამოყოფის დინამიკა და მიკროკაფსულების უსაფრთხოება. დადგენილია მიკროკაფსულების მიღების ოპტიმალური პირობები და მიკროკაფსულირებისთვის შერჩეულია ფსევდოპროტეინი 8L6. პრეკლინიკურ კვლევებში პირველად არის შესწავლილი ბიოდეგრადირებადი ფსევდოპროტეინის გამოყენებით მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ანტიოქსიდაციური ეფექტურობა, აუტიზმის ცხოველურ მოდელებში. შედეგად, პირველად დადასტურდა მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ქრონიკული გამოყენების მაღალი პრევენციული ეფექტურობა დარღვეული ანტიოქსიდაციური სტატუსის, მომატებული შიშის/შფოთვის და ძილის დარღვევების პრევენციაში, აუტიზმის ცხოველურ მოდელებში.

**სამუშაოს მიზანი.** სადოქტორო ნაშრომის კვლევის მიზანს შეადგენდა ყწ-ის მიკროკაფსულირება, კედლის მასალად ბიოდეგრადირებადი ფსევდოპროტეინის გამოყენებით, მისი დახასიათება, უსაფრთხოების და უპირატესობის დადასტურება. მიკროკაფსულირებული ყწ-ის უსაფრთხო, კონტროლირებადი, დოზირებული მიწოდების შესაძლო ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის კვლევა აუტიზმის ცხოველურ მოდელებში, რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების შემცველობაზე სისხლის პლაზმაში, ძილის დარღვევებზე და ემოციური ქცევის ისეთ მნიშვნელოვან პათოლოგიაზე, როგორცაა შფოთვა.

**მიზნის მისაღწევად 7 კონკრეტული კვლევის შესრულება იყო დაგეგმილი:**

1. ბიოდეგრადირებადი კედლის მასალების – 8L6-ის, 1L6-ის, 8L6-ისა და 1L6-ის თანაპოლიმერის სინთეზი და მათი თვისებების შედარებითი ანალიზი;
2. ყწ-ის მიკროკაფსულირება სხვადასხვა ფსევდოპროტეინზე დაფუძნებული ბიოდეგრადირებადი კედლის მასალების (8L6-ის, 1L6-ის

- და 8L6-ისა და 1L6-ის თანაპოლიმერი) გამოყენებით; ყწზ-ით დატვირთული მიკროკაფსულების ემულსიების მიღება.
3. მიკროკაფსულების ეფექტურობის დამოკიდებულების კვლევა სხვადასხვა ფიზიკურ-ქიმიურ პირობებზე, უპირატესი თვისებების მქონე ყწზ-ით დატვირთული მიკროკაფსულების ემულსიების შერჩევა და მისი უსაფრთხოების დადასტურება.
  4. აუტიზმის ცხოველური მოდელების გამოყვანა ვალპროის მჟავას ადრეული პრენატალური გამოყენებით, მაკე ვირთაგვებში და საკონტროლო მოდელების გამოყვანა ფიზიოლოგიური ხსნარის ადრეული პრენატალური გამოყენებით.
  5. რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების კონცენტრაციის ცვლილებების შესწავლა აუტიზმის ვკმ-ცხოველური მოდელების სისხლის პლაზმაში და ახალი მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის პრეკლინიკური კვლევა.
  6. შფოთვის ემოციური ქცევის ცვლილებათა ხასიათის შესწავლა და ახალი მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის ქრონიკული გამოყენების ეფექტურობის პრეკლინიკური კვლევა აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ და საკონტროლო, ფიზიოლოგიურ მოდელებში;
  7. ძილის დარღვევების ხასიათის შესწავლა და ახალი მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის ქრონიკული გამოყენების ეფექტურობის პრეკლინიკური კვლევა, აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ და საკონტროლო, ფიზიოლოგიურ მოდელებში.

**კვლევის ობიექტი და მეთოდები:** პრეკლინიკური კვლევები ჩატარებულია თეთრ ვირთაგვებზე (10 ვირთაგვა თითოეულ ჯგუფში). ფსევდოპროტეინების, (8L6-ის, 1L6-ის, 8L6-ისა და 1L6-ის თანაპოლიმერის) სინთეზისთვის ფაზათაშორისი პოლიმერიზაციის მეთოდია გამოყენებული, მოლეკულური მასები GPC-ქრომატოგრაფიით დადგინდა. ყწზ-ის მიკროკაფსულირება, სხვადასხვა ფსევდოპროტეინების კედლის მასალით, განხორციელდა ემულსიფიკაციის მეთოდის ერთ-ერთი ვარიანტით - ზეთი წყალში. ყწზ-ით დატვირთული მიკროკაფსულების ფიზიკური პარამეტრები დადგინდა სტატიკური შუქგაბნევის მეთოდით, ლაზერული მიკროსაიზერით, ზეთის ინკაფსულირების ეფექტურობის მაჩვენებლები დადგენილია სპექტრომეტრული მეთოდით და სინათლის

მიკროსკოპით. ახალი მიკროკაფსულირებული ყწ-ის უსაფრთხოება შესწავლილია მისი ქრონიკული (14 დღიანი) გამოყენებით აუტიზმის ცხოველურ და საკონტროლო მოდელებში. ანტიოქსიდაციური ეფექტურობა, სისხლის პლაზმაში რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების შემცველობაზე, შესწავლილია ახალი ინტეგრირებული ანალიტიკური სისტემის - FRAS 5 Evolve საშუალებით. შფოთვის ცვლილებები და ყწ-ის პრევენციული ეფექტურობა შესწავლილია აწეულ ჯვარედინ ლაბორინტში. ეგ რეგისტრაციისთვის საჭირო ელექტროდების ჩანერგვა თავის ტვინის სტრუქტურებში ხდებოდა სტერეოტაქსული მეთოდით, Stoelting-ის ფირმის თანამედროვე სტერეოტაქსული აპარატით, ძილის კომპიუტერული ეგ რეგისტრაცია SAGURA EEG@PSG-ით ხდებოდა.

**კვლევის ძირითადი შედეგები და გამოყენების სფერო.** სადისერტაციო ნაშრომის შედეგებს აქვს მნიშვნელოვანი პრაქტიკული ღირებულება ასდ ბავშვებისა და მოზარდების მდგომარეობის შემსუბუქების თვალსაზრისით, ვინაიდან, შორეულ, პერსპექტიულ მიზანს წარმოადგენს მიკროკაფსულირებული ყწ-ის დოზირებული გამოყენება მოხალისე ასდ ბავშვებში და მოზარდებში, საკვები დანამატის სახით, რაც არ შექმნის საკვების სუნისა და გემოს შეცვლის პრობლემას და სადი პროდუქტის, დოზირებული, უსაფრთხო და კონტროლირებადი მიწოდების საშუალებას მოგვცემს. გარდა ამისა, ყწ-ის მიკროკაფსულის ზომები უზრუნველყოფს მის ერთგვაროვან შერევას საკვებ რეცეპტურებში, რაც საკვებთან ერთად პირის ღრუში მოხვედრისას, ზეთის კაფსულის ცალკე კომპონენტად მექანიკურ აღქმას გამორიცხავს. ეს ძალიან მნიშვნელოვანია, ვინაიდან ასდ ბავშვებს აკვიატებული, სტერეოტიპური ქცევების გარდა, კონკრეტული პერიოდების მიხედვით, აკვიატებული საკვებიც აქვთ, და კვებით დანამატმა მათი რუტინის დარღვევა არ უნდა გამოიწვიოს.

**ნაშრომის აპრობაცია:** სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი დებულებები მოხსენდა ორ საერთაშორისო კონფერენციაზე:

1. Khatuna Bezhanishvili, Mariam Babilodze, Neli Maglakelidze, Nino Rogava, Nargiz Nachkebia. Evaluation of the efficacy of microencapsulated grape seed oil on changes in anxiety and innate fear in VPA-model of autism. FENS Regional Meeting, 2023, Algarve, Portugal;



2. ხათუნა ბეჟანიშვილი, დარეჯან ხარაძე, თინა ომიადე, თეიმურაზ ბუაჩიძე, თემურ ქანთარია, ნარგიზ ნაჭყებია, რამაზ ქაცარავა. ყურძნის წიპწის ზეთის მიკროკაფსულირება და მისი ანტიოქსიდაციური ეფექტურობა აუტიზმის ვპმ-მოდელში. აკადემიკოს გივი ცინცაძის დაბადებიდან 90 წლისადმი მიძღვნილი საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენცია „ქიმია - მიღწევები და პერსპექტივები“ 2023, თბილისი, საქართველო.

**სადისერტაციო ნაშრომის მოცულობა და სტრუქტურა:** სადისერტაციო ნაშრომი შედგება შემდეგი ნაწილებისგან: რეზიუმე (ორ ენაზე), შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა/საკვლევი პრობლემის შესწავლის დონე, კვლევის მასალა და მეთოდები, სამეცნიერო პრობლემის კვლევა და კვლევის შედეგების შეჯერება, დასკვნები და გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხა. სადისერტაციო ნაშრომი წარმოდგენილია 146 ნაბეჭდ ფურცელზე და შეიცავს 9 ცხრილს, 15 სქემას, 36 სურათს და 105 ციტირებულ ლიტერატურას.

დისერტაციის პირველი ნაწილი ლიტერატურის მიმოხილვას უკავია, სადაც სადისერტაციო თემის ფარგლებში არსებული ლიტერატურის განხილვა და ანალიზია წარმოდგენილი. ეს ნაწილი ხუთ დიდ ქვეთავად არის დაყოფილი. პირველ ქვეთავში ვრცლად არის განხილული მონაცემები ზეთების კაფსულირების და მეთოდების შესახებ. მეორე ქვეთავში სამკურნალო პრეპარატების კონტროლირებადი მიწოდების სისტემები, ბიოსამედიცინო მასალები ამინომჟავების საფუძველზე, წამლების მიწოდების სისტემებისთვის და მათი გამოყენების პერსპექტივებია განხილული. მესამე ქვეთავი ყურძნის წიპწის ზეთის და მისი ანტიოქსიდაციური მოქმედების უნარის მიმოხილვას ეძღვნება. მეოთხე ქვეთავი აუტიზმის სპექტრის დარღვევას, მის სიმპტომატიკას და მისი პათოგენეზის ერთ-ერთი ძირითადი ფაქტორის, ანტიოქსიდაციური დისბალანსის ანალიზს წარმოგვიდგენს. მეხუთე ქვეთავში კვლევის მიზანი და ამოცანებია ჩამოყალიბებული.

სადისერტაციო ნაშრომის მეორე ნაწილში კვლევის მასალის და მეთოდების აღწერაა წარმოდგენილი, კონკრეტული კვლევების პროტოკოლებით. მესამე ნაწილი სამეცნიერო პრობლემის კვლევას და კვლევის შედეგების შეჯერებას ეძღვნება. ნაშრომის ძირითადი შედეგები, კონკრეტულ თავებშია აღწერილი.

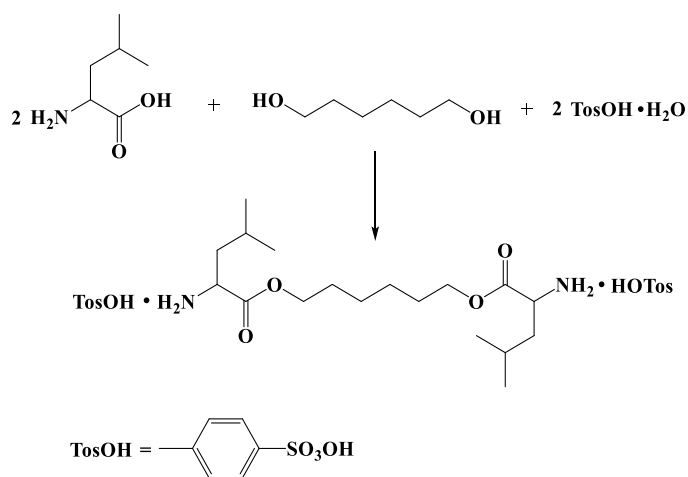
თავი 1. ბიოდეგრადირებადი კედლის მასალების – 8L6–ის, 1L6–ის, 8L6–ისა და 1L6–ის თანაპოლიმერის სინთეზი, მათი თვისებების შედარებითი ანალიზი.

ყწზ-ის მიკროკაფსულირებისთვის სამი სხვადასხვა სტრუქტურის ფსევდოპროტეინი შევარჩიეთ: 1L6-პოლიესტერმარდოვანა, ამინომჟავა L-ლეიცინის საფუძველზე; 8L6-პოლიესტერამიდი, ამინომჟავა L-ლეიცინის საფუძველზე; და [1L6]<sub>0.8</sub> [8L6]<sub>0.2</sub>, პოლიესტერმარდოვანას და პოლიესტერამიდის თანაპოლიმერი, ამინომჟავა L-ლეიცინის საფუძველზე, თანაფარდობით 0.8:0.2.

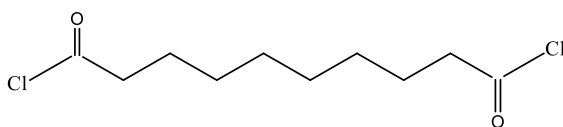
ბიოდეგრადირებადი კედლის მასალის - ფსევდოპროტეინების სინთეზის პირველ ეტაპს მათი მონომერების მიღება წარმოადგენდა.

**პოლიესტერამიდი - 8L6** - სეზაციის მჟავას (8), ამინომჟავა L-ლეიცინის (L) და 1,6-ჰექსანდიოლის (6) საფუძველზე.

**მონომერის სინთეზი.** ფსევდოპროტეინის - 8L6-ის სინთეზისთვის აუცილებელი საკვანძო **ბის-ნუკლეოფილური მონომერი L6** (ბის-(L-ლეიცინ)- $\alpha,\omega$ -ჰექსამეთილენ დიესტერის დი-p-ტოლუოლსულფომჟავას მარილი) დავასინთეზეთ  $\alpha$ -ამინომჟავა L-ლეიცინისა (2.0 მოლი) და 1,6-ჰექსანდიოლის (1.0 მოლი) პირდაპირი კონდენსაციით p-ტოლუოლსულფომჟავას მონოჰიდრატის (2.1 მოლი - მცირე სიჭარბე) თანაობისას ციკლოჰექსანში დუდილით. ნედლი პროდუქტი გავასუფთავეთ წყლიდან გადაკრისტალებით. მივიღეთ თეთრი ფერის ფხვნილი გამოსავლიანობით 99% და ღებობის ტემპერატურით 190-192°C.



სქემა 1. მონომერ L6 (ბის-(L-ლეიცინ)- $\alpha,\omega$ -ჰექსამეთილენ დიესტერის დი-p-ტოლუოლსულფომჟავას მარილის) სინთეზის სქემა.



**სქემა 2. ბის-ელექტროფილური მონომერი სებაცილქლორიდი**

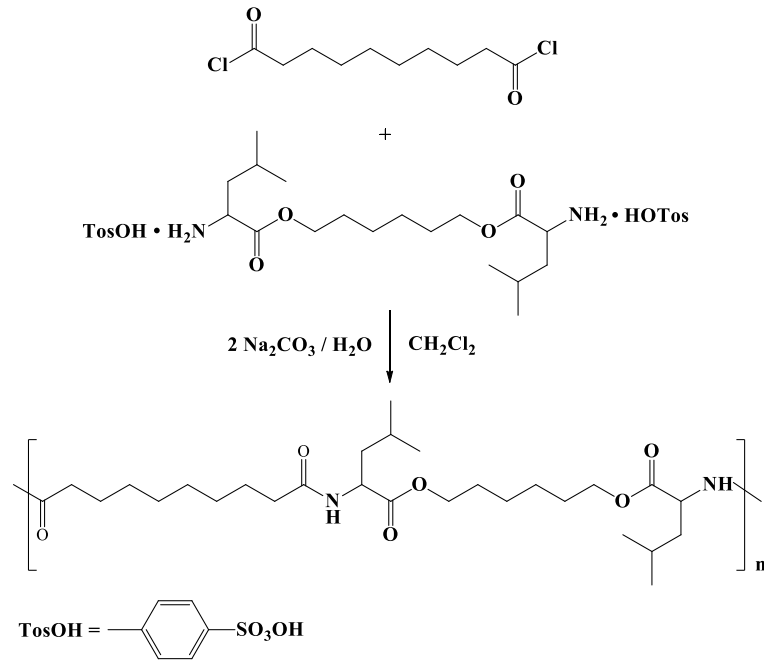
ფსევდოპროტეინი 8L6 მივიღეთ ფაზათაშორისი პოლიკონდენსაციის მეთოდით მიღებული ბის-(L-ლეიცინ)- $\alpha,\omega$ -ჰექსამეტილენ დიესტერის დი-p-ტოლუოლსულ-ფომჰავა მარილის ურთიერთქმედებით სებაცილქლორიდთან. Merck (Sigma Aldrich); ბრუტო ფორმულა:  $C_{10}H_{16}Cl_2O_2$ ;  $M_w = 239.14$ ;  $T_{\text{ლ}} = -2.5^{\circ}C$ ;  $T_{\text{დუ}} = 220^{\circ}C$ .

პოლიკონდენსაციის ჩასატარებლად დავამზადეთ ორი ფაზა: წყლის ფაზა და ორგანული ფაზა. 1. **წყლის ფაზა** - 5.0 მმოლი (ბის-(L-ლეიცინ) $\alpha,\omega$ -ჰექსამეტილენ დიესტერის დი-p-ტოლუოლსულფომჰავა მარილი L6 და 10.0 მმოლი ნატრიუმის კარბონატი გავხსენით 30მლ წყალში; 2. **ორგანული ფაზა** - 5.0 მმოლი სებაცილქლორიდი გავხსენით 30 მლ უწყლო დიქლორმეთანში.

პოლიმერის სინთეზისთვის L6 მარილისა და კარბონატის ხსნარს, მუდმივი მორევის პირობებში, ნელი სიჩქარით, წვეთ-წვეთობით, 30 წუთის განმავლობაში, ვამატებდით სებაცილქლორიდის ხსნარს დიქლორმეთანში. ორგანული ფაზის სრული დამატების შემდეგ მორევა გრძელდებოდა კიდევ 20 წთ განმავლობაში. მიღებულ ნარევს, აქროლადი დიქლორმეთანი მოვაცილეთ, როტაციული ამორთქლებელის გამოყენებით. პოლიმერი ზედმიწევნით გავრეცხეთ გამოხდილი წყლით და გავაშრეთ ვაკუუმში

დავამუშავეთ ფსევდოპროტეინი 8L6 რეაქციის თანამდე პროდუქტებისგან ზედმიწევნით გაწმენდის, ე.წ. გადალექვის მეთოდით. ფსევდოპროტეინი (10გ) გავხსენით 100 მლ ორგანულ გამხსნელში და მიღებული ხსნარი ულუფებით, ნელ-ნელა, გამოვლექეთ მდულარე გამოხდილ წყალში. მიღებული ფსევდოპროტეინი გავფილტრეთ და რამდენიმეჯერ გავრეცხეთ ჯერ ცხელი წყლით, შემდეგ კი ცივით. მიღებული ნაერთი, მარილებისგან გასუფთავებული, გავაშრეთ ვაკუუმ საშრობში  $40-50^{\circ}C$ -ზე და განმეორებით გავხსენით დიქლორმეთანში და გამოვლექეთ ეთილაცეტატში, ნარევი დავაყოვნეთ 24 სთ, გავფილტრეთ და გავაშრეთ ოთახის ტემპერატურაზე.

**8L6-ის მახასიათებლებია:** 8L6 - გამოსავალი 100%, დაყვანილი სიბლანტე  $\square\square\square\square$  2.99 დლ/გ; ბრუტო ფორმულა:  $(C_{28}H_{50}N_2O_6)_n$ ; C-65.88 H-9.75 N-5.60;  $T_g = 37^\circ C$  (DSC);  $M_w=137\ 000$ ,  $M_n = 88\ 000$   $M_w/ M_n = 1.56$  (GPC); იწ-სპექტრებში აღინიშნება პიკები კარბონილის ჯგუფის  $-1648-1650\ cm^{-1}$ , (ამიდი-I )  $1538-1542\ cm^{-1}$ , (ამიდი II ), ესტერის -  $1738-1742\ cm^{-1}$  და NH  $-3290\ cm^{-1}$ , ქიმოტრიფსინოლიზის სიჩქარეა 7.5 მიკრომოლი/70წთ (ავტომატური პოტენციო-მეტრული ტიტრატორი: 842 ტიტრანდო).



სქემა 3. ფსევდოპროტეინ 8L6-ს სინთეზის სქემა.

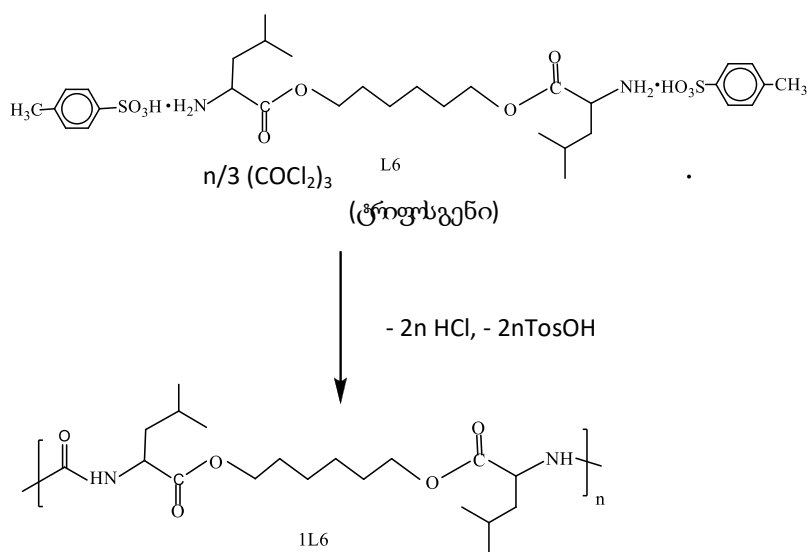


სურათი 1. ფსევდოპროტეინ 8L6-ს მიკროსკოპული გამოსახულება

## პოლიესტერშარდოვანა 1L6 ამინომჟავა L-ლეიცინის საფუძველზე

პოლიესტერშარდოვანას (1L6) სინთეზისთვის 5.0 მმოლ ბის (L-ლეიცინის)  $\alpha,\omega$ -ჰექსამეთილენ დიესტერის დი-p-ტოლუოლ-სულფომჟავა მარილს (L6) და 5.0 მმოლ სოდას ვათავსებდით სარეაქციო კოლბაში, ვამატებდით 30მლ გამოხდილ წყალს და ვურევდით ოთახის ტემპერატურაზე (20-25<sup>0</sup> C), სრულ გახსნამდე. მიღებულ ხსნარს ერთბაშად ვამატებდით 5.0 მმოლ ტრიფოსფენის ხსნარს 30 მლ დიქლორმეთანში, მორევას ვაგრძელებდით ოთახის ტემპერატურაზე 20 წუთის განმავლობაში.

მიღებულ სარეაქციო ნარევს ვაყოვნებდით 1 სთ-ის განმავლობაში, შემდეგ სარეაქციო ნარევს დეკანტაციით ვაშორებდით ზედა ფენას - წყლის ფენას, დარჩენილ ნარევს მეთილენქლორიდს ვაშორებდით გადადენით. მიღებულ პოლიმერს ვაშრობდით საშრობ კარადაში 100- 110<sup>0</sup>C-ზე მუდმივ წონამდე.



სქემა 4. პოლიესტერშარდოვანას 1L6-ის სინთეზი

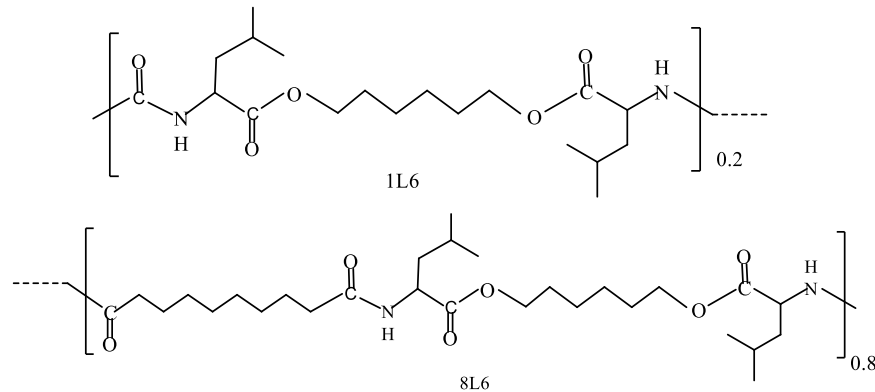
**1L6-ის მახასიათებლები:** 1L6 - გამოსავალი 93-98%, დაყვანილი სიბლანტე 0, 59 დლ/გ; ბრუტო ფორმულა:  $(\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6)_n$ ; C-59.046; H-8.86; N-7.25;  $T_g = 58^\circ\text{C}$  (DSC);  $M_w=46\ 000$ ,  $M_n = 32\ 000$   $M_w/ M_n = 1.46$  (GPC); იწ-სპექტრებში აღინიშნება პიკები: ესტერული კარბონილის ჯგუფის ( $-\text{C}=\text{O}$ )  $-1726\ \text{სმ}^{-1}$ , შარდოვანული კარბონილის ჯგუფის ( $-\text{C}=\text{O}$ )  $1629\ \text{სმ}^{-1}$ , შარდოვანული ( $-\text{NH}-$ ) და ( $-\text{C}-\text{N}-$ )  $-1562\ \text{სმ}^{-1}$ ; ამიდის ( $-\text{C}=\text{O}$ )

NH -) - 3300 სმ<sup>-1</sup>, ქიმოტრიფსინოლიზის სიჩქარეა 0.05 მგ/60წთ (ავტომატური პოტენციომეტრული ტიტრატორი: 842 ტიტრანდო).

**პოლიესტერზარდოვანას 1L6 და პოლიესტერამიდის 8L6 თანაპოლიმერის**

**[1L6]<sub>0.8</sub> [8L6]<sub>0.2</sub> სინთეზი**

[1L6]<sub>0.8</sub> [8L6]<sub>0.2</sub> მივიღეთ ჰომოპოლიმერების ანალოგიურად. მისი სტრუქტურა მოტანილია სქემა 5-ზე.



**სქემა 5. პოლიესტერზარდოვანას 1L6 და პოლიესტერამიდის 8L6 [1L6]<sub>0.8</sub> [8L6]<sub>0.2</sub> სტრუქტურა.**

თავი 2. ყწ-ის ზეთის მიკროკაფსულირება სხვადასხვა ფსევდოპროტეინზე დაფუძნებული კედლის მასალების (8L6-ის, 1L6-ის და 8L6-ისა და 1L6-ის თანაპოლიმერი) გამოყენებით; ყწ-ის მიკროკაფსულების ემულსიების მიღება. ყწ-ის მიკროკაფსულირებისთვის გამოვიყენეთ ემულსიფიკაციის მეთოდის ერთ-ერთი ვარიანტი, ვარიანტი ზეთი წყალში (O/W). დავამზადეთ ორი ხსნარი: **ხსნარი #1.** ავწონეთ 0,06გ ფსევდოპროტეინი - (8L6), გავხსენით 2 მლ დიმეთილსულფოქსიდში, მუდმივი მორევის პირობებში (მაგნიტური სარეველა, მორევის სიჩქარე ~ 1000 ბრუნი/წუთში), ოთახის ტემპერატურაზე (საჭიროების შემთხვევაში შეიძლება შეთბობაც 30°C-ზე), სრული გახსნის შემდეგ დავამატეთ 0,012გ, (კედლის მასის 20%) ყწ და გავაგრძელეთ მორევა სრულ გახსნამდე (15-20 წთ); **ხსნარი #2.** ავწონეთ 0,5229გ ზედაპირულად აქტიური ნაერთი Tween-20 (სორბიტანმონოლაურატი, M<sub>w</sub>=1228) დავამატეთ 100 მლ გამოხდილი წყალი და გავხსენით მუდმივი მორევის პირობებში, ნელ სიჩქარეზე - აქაფების თავიდან აცილების მიზნით. მიღებული ხსნარი გავფილტრეთ, მისი 10 მლ მოვათავსეთ სტერილურ ბიუქსში და მუდმივი მორევის პირობებში, ნელი სიჩქარით, ~ 12

წვეთი/წთ-ში, დავამატეთ 1 მლ ფსევდოპროტეინისა და ყწ-ის ხსნარი (ხსნარი #1). მივიღეთ მდგრადი ემულსია  $MPD (nm) \pm SD = 94.6 \pm 0,3$ ;  $PDI \pm SD = 0.120 \pm 0,019$ ; პროცესი ჩავატარეთ სტერილური პირობების მაქსიმალური დაცვით.

მიღებული, ახალი, ყწ-ით დატვირთული ბიოდეგრადირებადი მიკროკაფსულების ემულსია სტაბილურობას,  $+4-5^{\circ}C$ -ზე, 5-6 თვის განმავლობაში ინარჩუნებს. იგივე პროცედურების გამოყენებით მოვახდინეთ ყწ-ის მიკროკაფსულირება ფსევდოპროტეინების - 1L6-ის, და 1L6-ისა და 8L6-ის თანაპოლიმერის კედლის მასალით.

**თავი 3. მიკროკაფსულების ეფექტურობის დამოკიდებულების კვლევა სხვადასხვა ფიზიკურ-ქიმიურ პირობებზე, უპირატესი თვისებების მქონე ყწ-ით დატვირთული მიკროკაფსულების ემულსიის შერჩევა და მისი უსაფრთხოების დადასტურება.**

შევისწავლეთ მიკროკაფსულირების პროცესის სხვადასხვა კანონზომიერებები, კერძოდ, მიკრონაწილაკების ზომებისა და მდგრადობის დამოკიდებულება: 1. ფსევდოპროტეინების კონცენტრაციის ცვლილებებზე; 2. ზედაპირულად აქტიური ნაერთების ბუნებაზე; 3. პოლიმერის სტრუქტურაზე; 4. წყლის ფაზის მორევის სიჩქარეზე. პროცესის წარმატებით განხორციელებისთვის, ორგანული გამხსნელის შერჩევა იყო მნიშვნელოვანი, ისეთი გამხსნელის გამოყენება, რომელშიც მიღებული პოლიმერები გაიხსნებოდა და ამავე დროს, მას უნდა ჰქონოდა წყლის ფაზასთან შერევის უნარი. ჩვენ მიერ სინთეზირებული ფსევდოპროტეინები 8L6, 1L6 და თანაპო-ლიმერი  $[1L6]_{0,8} [8L6]_{0,2}$ , ხსნადი აღმოჩნდა წყალთან შერევის უნარის მქონე ჰიდროფილურ გამხსნელებში, როგორცაა: დიმეთილსულფოქსიდი (DMSO); დიმეთილფორმამიდი (DMF); აცეტონი. უპირატესობა მივანიჭეთ DMSO-ს, რომელიც, კარგი ხსნადობის უნარის გარდა, უსაფრთხოა ორგანიზმისთვის და გამოიყენება სამკურნალო საშუალებად, დიმექსიდის სახელწოდებით.

დავამზადეთ ორი ხსნარი: 1. ორგანული ფაზა, ფსევდოპროტეინი 8L6 გავხსენით DMSO-ში და მუდმივი მორევის პირობებში, დამატეთ ყწ, პოლიმერის მასის 20% ოდენობით; 2. წყლის ფაზა, ზედაპირულად აქტიური ნაერთის წყალხსნარი კონცენტრაციით,  $c = 5$  მგ/მლ.

მიკრონაწილაკების მისაღებად, ტიპურ ექსპერიმენტში, წყლის ფაზას, ოთახის ტემპერატურაზე, სხვადასხვა სიჩქარეზე, მუდმივი მორევის პირობებში

(მაგნიტური სარეველას გამოყენებით), ვამატებდით ორგანული ფაზის 1 მლ, წვეთობით, დაბალი სიჩქარით (12 წვეთი/წთ); ვზომავდით მიღებული პროდუქტების პარამეტრებს- MPD (ნაწილაკების დიამეტრი) და PDI, ზომების განაწილება (პოლიდისპერსიულობის ინდექსი) ანალიზატორის გამოყენებით, 25°C-ზე.

პირველ რიგში, შევისწავლეთ ორგანული ფაზის კონცენტრაციის გავლენა ნაწილაკების ზომებსა და მდგრადობაზე. დავამზადეთ 8L6-ის ხსნარები კონცენტრაციით: c=1მგ/მლ; c=3მგ/მლ; c=6მგ/მლ; ზედაპირულად აქტიურ ნივთიერებებად გამოვიყენეთ Tween-20 (სორბიტანმონოლაურატი,  $M_w=1228$ ) და Tween-40 (სორბიტანმონოპალმიტატი,  $M_w=1277$ ).

**ცხრილი 1. 8L6-ის ორგანული ფაზის კონცენტრაციისა და ზედაპირულად აქტიური ნაერთების ბუნების გავლენა ნანონაწილაკების ზომებსა და პოლიდისპერსიულობაზე\***

| #  | კონცენტრაცია, c | Tween-20    |               | Tween-40    |              |
|----|-----------------|-------------|---------------|-------------|--------------|
|    |                 | MPD± SD     | PDI± SD       | MPD± SD     | PDI± SD      |
| 1. | 1.0 მგ/მლ       | 180.2 ± 1.6 | 0.120 ± 0.018 | 164.1 ± 0.8 | 0.170± 0.012 |
| 2. | 3.0 მგ/მლ       | 184.2±2.3   | 0.230± 0.013  | 170.6 ± 1.8 | 0.220± 0.015 |
| 3. | 6.0 მგ/მლ       | 240.6±2.2   | 0.360 ± 0.018 | 192.5 ± 1.2 | 0.340± 0.012 |

\*შენიშვნა: გამხსნელი DMSO, მორევის სიჩქარე 500 ბრ/წთ, ორგანული ფაზისა და წყლის ფაზის თანაფარდობა 1:10; მონაცემები წარმოდგენილია, როგორც სამი პარალელური გაზომვის საშუალო მნიშვნელობები ± სტანდარტული გადახრა (SD – standard deviation)

აღმოჩნდა, რომ ყველა განხორციელებულ ექსპერიმენტში, ფსევდოპროტეინის კონცენტრაციის გაზრდით (1.0 მგ/მლ - 6.0 მგ/მლ) ნანონაწილაკების ზომები იზრდება, თუმცა, 1.0 მგ/მლ და 3.0 მგ/მლ კონცენტრაციებზე მიღებული ნაწილაკების ზომების მნიშვნელობები, ცდომილების ფარგლებშია.

ეწზ-ის მიკროკაფსულების ჩამოყალიბების პროცესი და ნაწილაკების ზომები მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული ფსევდოპროტეინების სტრუქტურაზე. ამის გასარკვევად მიკროკაფსულირებისთვის გამოვიყენეთ ორი სხვადასხვა კლასის მასალა, პოლიესტერმარდოვანა **1L6**, ამინომჟავა L-ლეიცინის საფუძველზე და **8L6** - პოლიესტერამიდი, ამინომჟავა L-ლეიცინის საფუძველზე, ასევე მათი თანაპოლიმერი **[1L6]<sub>0.8</sub> [8L6]<sub>0.2</sub>** პოლიესტერმარდოვანას და პოლიესტერამიდის თანაპოლიმერი, თანაფარდობით (0.8:0.2).

გამოყენებულ სტრუქტურებს შორის უმჯობესი აღმოჩნდა პოლიესტერამიდი 8L6; მიუხედავად იმისა, რომ პოლიესტერმარდოვანას შემთხვევაში მიიღება



საკმაოდ პატარა ზომის მიკროკაფსულები, საშუალო დიამეტრით ( $101,5 \pm 0,8$ ) და ვიწრო პოლიდისპერსიულობით ( $0,272 \pm 0,019$ ), ისინი წარმოქნიან ემულსიებს, რომლებიც მდგრადი აღმოჩნდა ( $+ 4^{\circ} C$ ) მხოლოდ რამოდენიმე საათის განმავლობაში; მაცივარში 5-6 სთ-ის დაყოვნების შემდეგ ადგილი აქვს მათ ნაწილობრივ აგრეგაციას.

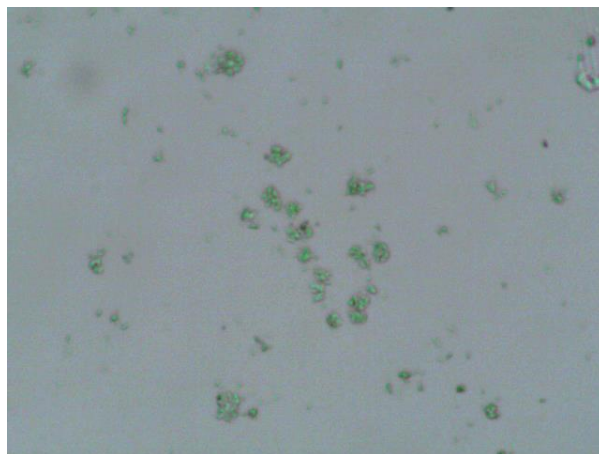
**ცხრილი 2. ფსევდოპროტეინების სტრუქტურის გავლენა ნანონაწილაკების ზომებზე და მდგრადობაზე\***

| #  | ფსევდოპროტეინის სტრუქტურა                      | MPD (nm)± SD    | PDI ± SD          | დამატებითი ინფორმაცია                   |
|----|--|-----------------|-------------------|---|
| 1. | <b>1L6</b>                                     | $101,5 \pm 0,8$ | $0,272 \pm 0,019$ | ნანონაწილაკები ნაწილობრივ აგრეგირებულია |
| 2. | <b>8L6</b>                                     | $94.6 \pm 0,3$  | $0.120 \pm 0,019$ | ნანონაწილაკები სტაბილურია               |
| 3. | <b>[1L6]<sub>0.8</sub> [8L6]<sub>0.2</sub></b> | $110,1 \pm 0,8$ | $0,169 \pm 0,011$ | ნანონაწილაკები სტაბილურია               |

**\*შენიშვნა:** ჩატარებულია ზედაპირულად აქტიური ნაერთის Tween-20-ის თანაობისას, მორევის სიჩქარე 1000 ბრ/წთ; მონაცემები წარმოდგენილია, როგორც სამი პარალელური გაზომვის საშუალო მნიშვნელობები ± სტანდარტული გადახრა (SD – standard deviation).

ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ფაქტორი, რომელიც მიკროკაფსულების ჩამოყალიბების პროცესზე ახდენს გავლენას, წყლიანი ფაზის მორევის სიჩქარეა.

ამ დამოკიდებულების ხასიათის გამოკვლევის მიზნით, ემულსიფიკაციის პროცესი განვახორციელეთ წყლიანი ფაზის მორევის სხვადასხვა სიჩქარისას (250 ბრ/წთ, 400 ბრ/წთ, 1000 ბრ/წთ), მიღებული შედეგები მე-3 ცხრილშია მოყვანილი.



**სურათი 2. ყწზ-ის მიკროკაფსულების აგრეგაციის მიკროსკოპული სურათი კედლის მასალად ფსევდოპროტეინ 1L6-ის გამოყენების შემთხვევაში.**

ცხრილში მოყვანილი მონაცემები აჩვენებს, რომ წყლის ფაზის მორევის სიჩქარის გაზრდა ხელს უწყობს სამივე პოლიმერის მცირე ზომის მიკროკაფსულების ჩამოყალიბების პროცესს და ეს ტენდენცია, უფრო მკვეთრად, ხისტი სტრუქტურის პოლიესტერმარდოვანას - 1L6-ის შემთხვევაშია გამოხატული. აღმოჩნდა, რომ 1L6-ის შემთხვევაში, ნაწილაკების ნაწილობრივი აგრეგაციაც ბრუნვის სიჩქარეზე დამოკიდებულებას ამჟღავნებს, თუმცა ის ყველა სიჩქარეზე შენარჩუნებული.

**ცხრილი 3. ფსევდოპროტეინების მორევის სიჩქარის გავლენა მიკრონაწილაკების ზომებზე და მდგრადობაზე\***

| #  | ფსევდო-პროტეინის სტრუქტურა                | მორევის სიჩქარე, ბრ/წთ | MPD (nm)± SD | PDI ± SD      | დამატებითი ინფორმაცია |
|----|---|------------------------|--------------|---------------|-----------------------|
| 1. | 1L6                                       | 250                    | 692,4 ± 15,4 | 0,474 ± 0,021 | ნაწილობრივი აგრეგაცია |
| 2. | 1L6                                       | 500                    | 540.2± 12,4  | 0.435 ± 0,021 | ნაწილობრივი აგრეგაცია |
| 3. | 1L6                                       | 1000                   | 101,5 ± 0,8  | 0,272 ± 0,019 | ნაწილობრივი აგრეგაცია |
| 4. | 8L6                                       | 250                    | 370.4 ± 2.3  | 0.280 ± 0.032 | ემულსია სტაბილურია    |
| 5. | 8L6                                       | 500                    | 184.2±2.3    | 0.230± 0.013  | ემულსია სტაბილურია    |
| 6. | 8L6                                       | 1000                   | 94.6 ± 0,3   | 0.120 ± 0,019 | ემულსია სტაბილურია    |
| 7. | [1L6] <sub>0.2</sub> [8L6] <sub>0.8</sub> | 250                    | 420.6±8.3    | 0.383± 0.032  | ემულსია სტაბილურია    |
| 8. | [1L6] <sub>0.2</sub> [8L6] <sub>0.8</sub> | 500                    | 117,5 ± 0,3  | 0,121 ± 0,018 | ემულსია სტაბილურია    |
| 9. | [1L6] <sub>0.2</sub> [8L6] <sub>0.8</sub> | 1000                   | 110,1 ± 0,8  | 0,169 ± 0,011 | ემულსია სტაბილურია    |

\*შენიშვნა: ჩატარებულია ზედაპირულად აქტიური ნაერთის Tween-20-ის თანაობისას, მონაცემები წარმოდგენილია როგორც სამი პარალელური გაზომვის საშუალო მნიშვნელობები ± სტანდარტული გადახრა (SD – standard deviation).

ყწზ-ის მიკროკაფსულირების პროცესის ერთ-ერთი საკვანძო საკითხი ფსევდოპროტეინის და ყწზ-ის იმ ოპტიმალური თანაფარდობის დადგენაა, რომლის დროსაც კაფსულებში ზეთის სრული ჩართვა ხდება, რაც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მიღებული პროდუქტის ორგანიზმში ადმინისტრირებისას.

აღნიშნული საკითხის შესწავლის მიზნით მიკროკაფსულირების პროცესი ჩავატარეთ ყწზ-ის და 8L6 სხვადასხვა წონითი თანაფარდობისას: 1. 10% : 90%; 2. 20% : 80%; 3. 30 % : 70%.

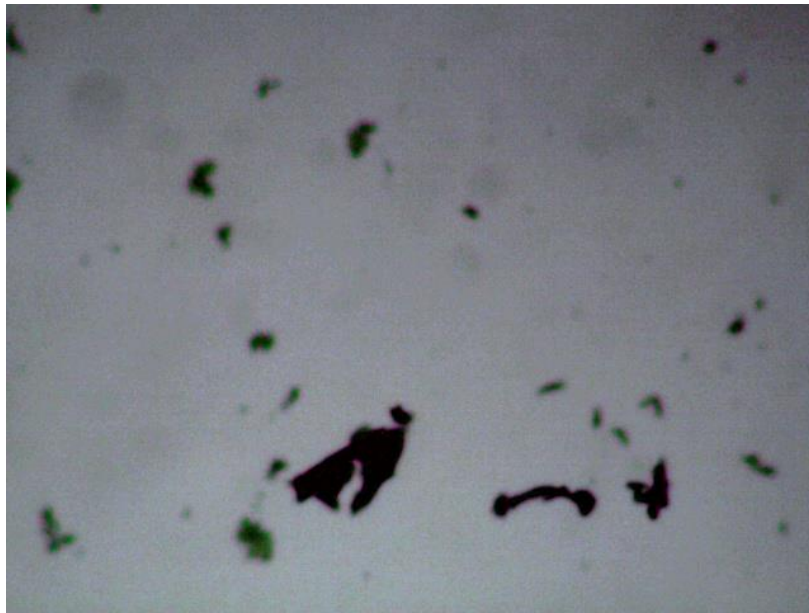
ყწზ-ისა და 8L6-ის 10%:90%-ზე და 20%:80%-ზე წონითი თანაფარდობებისას მიღებული მიკრონაწილაკების ემულსიები მდგრადია. მათი მიკროსკოპიული კვლევა ერთგვაროვანი სტრუქტურის არსებობას ადასტურებს, ხოლო ყწზ-ისა და 8L6-ის 30%:70%-ზე თანაფარდობისას, ემულსიებში, ყწზ წვეთების არსებობა შეიმჩნევა, როგორც ვიზუალურად, შეუიარაღებელი თვალით, ასევე მიკროსკოპულად (სურ.3).

**ცხრილი 4. ყწზ და 8L6 წონითი თანაფარდობების გავლენა მიკროკაფსულირების პროცესზე.**

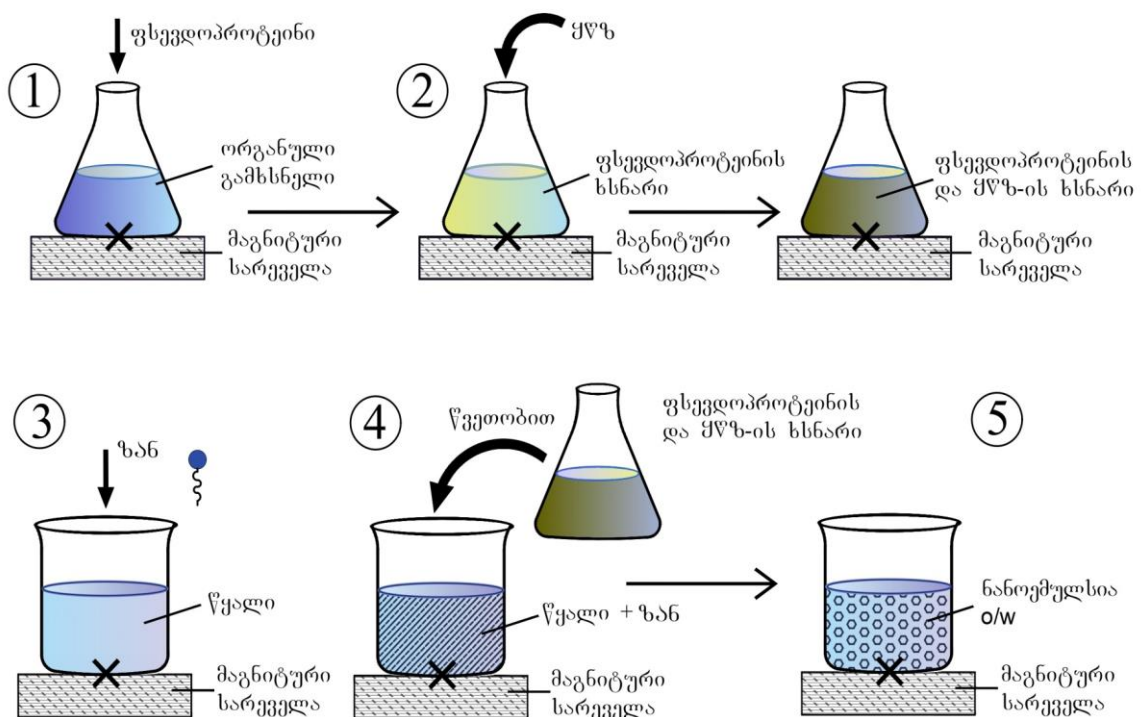
| #  | ყურძნის წიპწის ზეთის რაოდენობა, % | ფსევდოპროტეინის 8L6- რაოდენობა, % | MPD (nm) ± SD | PDI ± SD      | დამატებითი ინფორმაცია |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------------|-----------------------|
| 1. | 10                                | 90                                | 102,6 ± 0,8   | 0,230 ± 0,022 | ემულსია სტაბილურია    |
| 2. | 20                                | 80                                | 94.6 ± 0,3    | 0.120 ± 0,019 | ემულსია სტაბილურია    |
| 3. | 30                                | 70                                | -             | -             | --                    |

**\*შენიშვნა:** ჩატარებულია ზედაპირულად აქტიური ნაერთის Tween-20-ის თანაობისას, მონაცემები წარმოდგენილია როგორც სამი პარალელური გაზომვის საშუალო მნიშვნელობები ± სტანდარტული გადახრა (SD – standard deviation)

ამრიგად, დავადგინეთ ყწზ-ის ფსევდოპროტეინებით მიკროკაფსულირების პროცესის ოპტიმალური პირობები: მიკროკაფსულირებისთვის უკეთესი აღმოჩნდა 8L6; ორგანული ფაზის გამხსნელად DMSO; 8L6-ის კონცენტრაცია 3 მგ/მლ; ყწზ და 8L6 თანაფარდობა w/w 20%:80%; ორგანული და წყლის ფაზების თანაფარდობა 1:10; წყლის ფაზის მორევის სიჩქარე 1000 ბრ/წთ.



სურათი 3. მიკროკაფსულების ემულსიებში ყწზ-ის წვეთების სხვადასხვა ფორმის ჩანართების მიკროსკოპული სურათები, ყწზ-ისა და 8L6-ის 30%:70%-ზე თანაფარდობისას.



სქემა 5. ყწზ მიკროკაფსულირების სრული ტექნოლოგიური პროცესი, ემულსიფიკაციის მეთოდის ერთ-ერთი ვარიანტის, ზეთი წყალში (O/W) გამოყენებით

შემდეგი კვლევა მიკროკაფსულირებული ყწ-ის უსაფრთხოების დადასტურებას მიეძღვნა. ყწ-ს, ამერიკის საკვებისა და წამლის სააგენტოს (FDA) ინგრედიენტების უნიკალური იდენტიფიკატორი (930MLC8XGG) აქვს მინიჭებული. ის შეტანილია აგრეთვე გარემოს დაცვის სააგენტოს (EPA) ნივთიერებების რეესტრის სისტემაში - ზეთები, ყურძნის (8024-22-4). ეს გარემოებები საფუძველს გვაძლევდა, რომ გაგვერკვია მისი უსაფრთხოება, პრეკლინიკურ კვლევებში გამოყენების მიზნით. ამიტომ, ინტაქტურ ვირთაგვებზე, ჩატარდა მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ემულსიის შესაძლო მწვავე ტოქსიკური მოქმედების კვლევა - სასიკვდილო დოზის (LD50) დადგენა და ასევე ტოქსიკურობის ცალკეული სიმპტომების რეგისტრაცია. „ფარმაკოლოგიური საშუალებების უსაფრთხოების პრეკლინიკური შეფასების წესების“ მიხედვით დავადგინეთ მინიმალური სადღეღამისო დოზა 0.5 მლ. ამ დოზის 5-ჯერ მეტი რაოდენობა (2.5 მლ), ერთი ჯგუფის ვირთაგვებს (n=10), ეძლეოდა ინტრაპერიტონეალურად, მეორე ჯგუფს (n=10), საკვები დანამატის სახით.

ვაფასებდით ვირთაგვების ზოგადი ქცევის შემდეგი პარამეტრების სიხშირეს: კვლევითი ქცევა; ლოკომოცია; გრუმინგი; ვერტიკალური დგომა; გარემოში ორიენტაცია; დეფეკაცია; ურინაცია; სუნთქვის სიხშირე; მყისიერი ან დაყოვნებული სიკვდილი. ცხოველებზე უწყვეტი დაკვირვება მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ემულსიის მიღებიდან 4 საათის განმავლობაში გრძელდებოდა და შემდეგ, ყოველდღიურად, დღეში ერთხელ, 14 დღის განმავლობაში. დაკვირვების მთელი პერიოდის განმავლობაში, კვლევაში არსებული პარამეტრების მნიშვნელოვანი ცვლილებები არ აღირიცხა. ვირთაგვები, საცდელი პერიოდის განმავლობაში, სურვილის მიხედვით მოიხმარდნენ საკვებსა და წყალს. დაკვირვების 14 დღის განმავლობაში ცხოველების დაცემა არ რეგისტრირდა, შედეგად სასიკვდილო დოზის (LD50) გათვლა შეუძლებელი აღმოჩნდა. არ დადასტურდა, აგრეთვე, მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ემულიის ადგილობრივი გამღიზიანებლობის უნარი.

**თავი 4. აუტიზმის ცხოველური მოდელების გამოყვანა ვალპროის მჟავას ადრეული პრენატალური გამოყენებით, მაკე ვირთაგვებში და საკონტროლო მოდელების გამოყვანა ფიზიოლოგიური ხსნარის ადრეული პრენატალური გამოყენებით.**

აუტიზმის ცხოველური მოდელების გამოყვანა მაკე ვირთაგვებში ვალპროის მჟავას (ვპმ) ადრეული პრენატალური გამოყენებით ხდებოდა. აუტიზმის ცხოველური მოდელების ვალიდურობის ვიზუალური დადასტურება ხდებოდა კუდის მალფორმაციებით, რაც ვლინდებოდა დისტალური რკალისებრი მოხრის ან გადახრის სახით, განიხილება, როგორც ვალპროის მჟავას ტოქსიკურობის მარკერი.

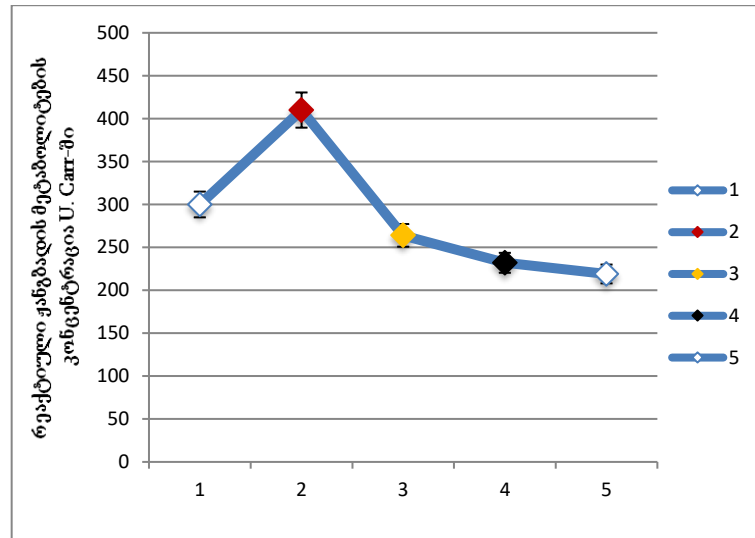
იმ დედა ვირთაგვების ნაშიერებიდან, რომლებიც ადრეულ პრენატალურ პერიოდში ვალპროის მჟავას ექვემდებარებოდნენ, თანდაყოლილი მალფორმაციები 71%-ს განუვითარდა - კუდის დეფორმაცია ყველაზე გავრცელებული მალფორმაცია იყო. საკონტროლო ფიზიოლოგიური ჯგუფის დედაებში მალფორმაციების რაოდენობა 0% შეადგენდა.

**თავი 5. რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების კონცენტრაციის ცვლილებების შესწავლა აუტიზმის ვპმ-ცხოველური მოდელების სისხლის პლაზმაში და ახალი, მიკროკავსულირებული ყწ-ის ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის პრეკლინიკური კვლევა.**

ახალი, მიკროკავსულირებული ყწ-ის ორკვირიანი დოზირებული მიწოდების ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის შესწავლამ რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების შემცველობაზე სისხლის პლაზმაში აჩვენა, რომ რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების კონცენტრაციის ზედა ზღვარი, საკონტროლო ფიზიოლოგიურ ვირთაგვებში, 300 U.Carr-ს შეადგენს. აუტიზმის ვპმ-ცხოველურ მოდელებში, ეს სიდიდე, სტატისტიკურად სარწმუნოდ იზრდება და საშუალოდ 400 U.Carr-ს უტოლდება, რაც სისხლის პლაზმაში თავისუფალი რადიკალების შემცველობის მატების მაჩვენებელია (სქემა 6).

მიკროკავსულირებული ყწ-ის დოზირებული ქრონიკული მიწოდების შედეგად რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების კონცენტრაცია დოზა-დამოკიდებულად მცირდება და დადგენილი ნორმების მინიმალურ ზღვარს ქვემოთ ინაცვლებს - 300 U.Carr ნორმა, 264 U.Carr-ი მიკროკავსულირებული ყწ-ის დღიური 1 მლ დოზის მიწოდების შემდეგ, 232 U.Carr დღიური 1.5 მლ დოზის მიწოდების შემდეგ, 219 U.Carr დღიური 2 მლ დოზის მიწოდების შემდეგ (სქემა 6. 3,4, და 5).

ამრიგად, სადოქტორო კვლევაში პირველად იქნა ნაჩვენები ახალი, მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ანტიოქსიდაციური ეფექტურობა რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების შემცველობაზე ვკმ-მოდელების სისხლის პლაზმაში.

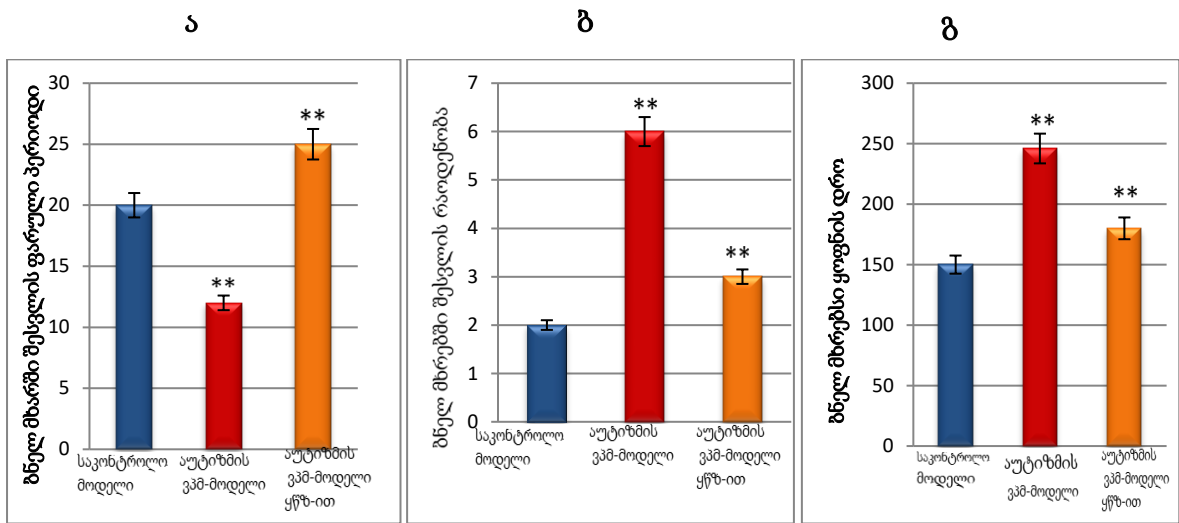


სქემა 6. მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ქრონიკული გამოყენების ეფექტურობა რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების კონცენტრაციაზე აუტიზმის ვკმ-მოდელებში.

თავი 6. შფოთვის ემოციური ქცევის ცვლილებათა ხასიათის შესწავლა და ახალი მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ქრონიკული გამოყენების ეფექტურობის პრეკლინიკური კვლევა აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ და საკონტროლო მოდელებში.

შიშისა და შფოთვის ცვლილებები აწეული ჯვარედინი ლაბორინთის (აჯლ) ტესტში შევისწავლეთ. აღმოჩნდა, რომ აუტიზმის ვკმ-მოდელებში, ფიზიოლოგიურ მოდელებთან შედარებით, აჯლ-ის სასტარტო პლატფორმიდან დახურულ მხარში შესვლის ლატენტური პერიოდი, მნიშვნელოვნადაა შემცირებული და 12 წამს უტოლდება (სურ.4.ა, წითელი სვეტი), რაც შიშისა და შფოთვის გაზრდის მაჩვენებელია. ეს პირველი მნიშვნელოვანი ცვლილებაა და მისი სწორი შეფასებისთვის უნდა აღინიშნოს, რომ ვირთაგვებს, ბუნებრივად აქვთ ღია, ნათელ სივრცეებში ყოფნის შიში და ამიტომ, ასეთი სივრცეებიდან თავის დაღწევის გზებს ეძებენ. აწეული ჯვარედინი ლაბორინთიც ამ პრინციპზეა აგებული და მისი ორი ბნელი (დახურული) მხრები, ცხოველებს, საშიში სივრცეებიდან (ღია მხრები და საწყისი პლატფორმა) თავის დაღწევის საშუალებას

ამღევს. ამიტომ, საკონტროლო, ფიზიოლოგიური მოდელები მინიმალური დაყოვნებით შერბიან ლაბირინთის ბნელ მხრებში (მარჯვნივ ან მარცხნივ).



**სურათი 4. მიკროკაფსულირებული ყწ ეფექტურობა: ა- აწეული ჯვარედინი ლაბირინთის ბნელ მხარეში შესვლის ფარულ პერიოდზე, ბ - ბნელ მხარეში შესვლის რაოდენობაზე და გ - ბნელ მხარეში ყოფნის ჯამური დროზე, 5 წთ პერიოდში. \*\*= $p<0.01$**

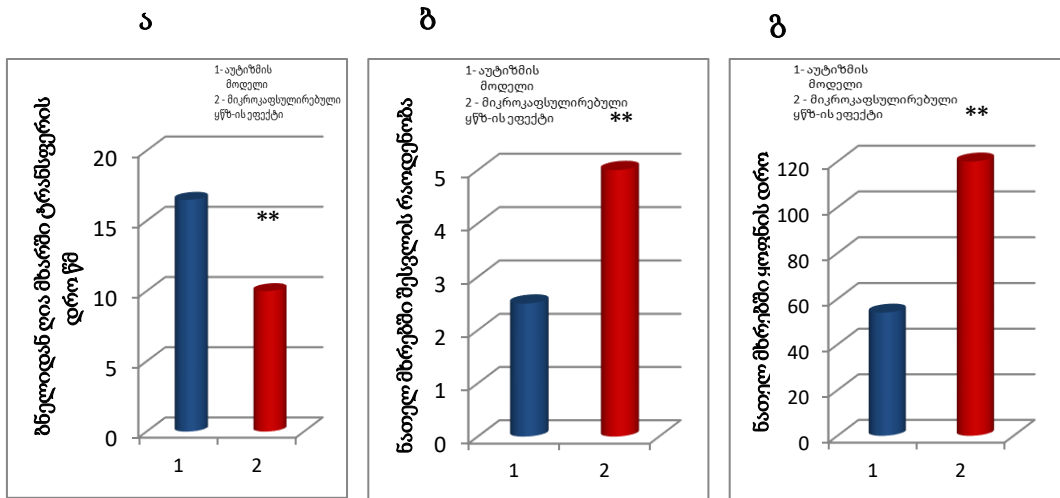
კვლევების ცალკე სერიაში, აუტიზმის ვპმ-ცხოველურ მოდელებში, შესწავლილ იქნა მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ეფექტურობა აუტიზმის ვპმ-მოდელებში აღწერილ დარღვევებზე, რომლებიც გაზრდილი შფოთვისა და შიშის ინდიკატორებია. ერთმანეთს შევადარეთ აწეული ჯვარედინი ლაბირინთის სხვადასხვა პარამეტრების მონაცემები აუტიზმის ვპმ-ცხოველურ მოდელებში, იმ ჯგუფებს შორის, რომლებმაც არ მიიღეს მიკროკაფსულირებული ყწ და რომლებიც იღებდნენ მას 14 დღის განმავლობაში.

აღმოჩნდა, რომ მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ქრონიკული მოქმედება ბნელ მხარეში შესვლის ფარული პერიოდის ცვლილებების პრევენციას ახდენს (სურ 4.ა, ნარიჯისფერი სვეტი). აუტიზმის ვპმ-მოდელებში გაზრდილია ბნელ მხრებში შესვლის რაოდენობა (სურ.4.ბ. წითელი სვეტი) და იქ ყოფნის ჯამური დრო (სურ.4.გ. წითელი სვეტი). დადასტურდა მიკროკაფსულირებული ყწ-ის მაღალი ეფექტურობა სურ.4-ზე მოტანილი სამივე პარამეტრის აღწერილ ცვლილებებზე (ნარიჯისფერი სვეტები).

ყწ-ის ემულსიის ეფექტურობა მაღალი აღმოჩნდა, აგრეთვე, აწეული ჯვარედინი ლაბირინთის ბნელიდან ნათელ მხარეში გადასვლის (ტრანსფერის) ფარული პერიოდის (სურ.5.ა, წითელი სვეტი), ნათელ მხარეში შესვლის



რაოდენობის (სურ. 5.ბ. წითელი სვეტი) და ნათელ მხარში ყოფნის ჯამური დროის (სურ. 5.გ. წითელი სვეტი) დარღვევების პრევენციის მიმართულებით.



სურ.5 მიკროკაფსულირებული ყწ ეფექტურობა: ა - ჯვარედინი ლაბირინთის ბნელიდან ნათელ მხარში გადასვლის ფარულ პერიოდზე, ბ - ნათელ მხარში შესვლის რაოდენობაზე 5 წთ პერიოდში, გ - ნათელ მხარში ყოფნის ჯამურ დროზე.  $**=p<0.01$

ამრიგად, სადოქტორო კვლევაში, პირველად იქნა ნაჩვენები ახალი, მიკროკაფსულირებული ყწ-ის მაღალი პრევენციული ეფექტურობა შიშისა და შფოთვის აშლილობებზე აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში.

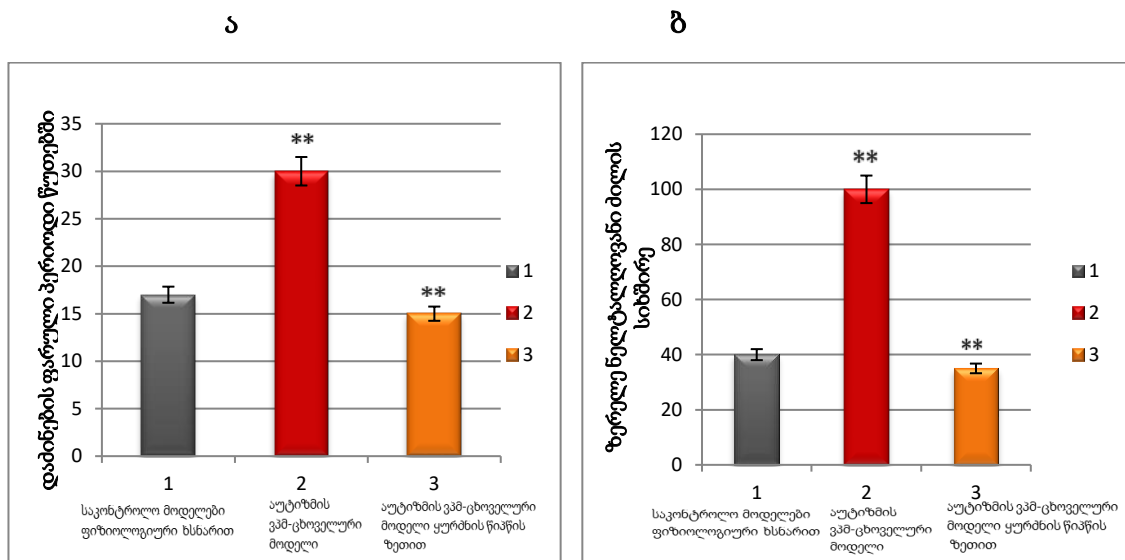
**თავი 7. ძილის დარღვევების ხასიათის შესწავლა და ახალი მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ქრონიკული გამოყენების ეფექტურობის პრეკლინიკური კვლევა აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ და საკონტროლო, ფიზიოლოგიურ მოდელებში.**

გამოკვლევების მომდევნო სერია მიემდგვნა ძილის დარღვევათა ხასიათის შესწავლას აუტიზმის სპექტრის დარღვევების მქონე ცხოველურ მოდელებში.

უნდა აღინიშნოს, რომ ძილი არ არის ერთგვაროვანი ფენომენი. მისი ფაზები და სტადიებია: ნელტალღოვანი ძილი, რომელიც ადამიანებში სამ სტადიად, ხოლო ცხოველებში, ორ სტადიად (ზერელე ნელტალღოვანი და ღრმა ნელტალღოვანი) იყოფა და პარადოქსული ძილი (ადამიანებში REM ძილი ანუ ძილი თვალების სწრაფი მოძრაობებით). ძილის შინაგანი სტრუქტურა ამ ფაზებისა და სტადიების თანამონაცვლეობით ყალიბდება, რაც მკაცრად განსაზღვრული წესების მიხედვით ხდება. ამ წესების დარღვევას, ხშირად, სავალალო შედეგი მოსდევს, რაც რიგი ფსიქონერვული დაავადებების განვითარებაში ვლინდება.

აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში დაძინების ფარული პერიოდი მკვეთრად მატულობს (სურ.6.ა.2) და ფიზიოლოგიური მოდელების მონაცემებს 2-ჯერ აღემატება. ახალი, მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის 14 დღიანი ქრონიკული გამოყენება დაძინების ფარული პერიოდის მკვეთრ შემცირებას იწვევს და ეს სიდიდე ნორმის მაჩვენებელს უბრუნდება (სურ.6.ა,3). ძილის ერთ-ერთ სერიოზულ დარღვევას, აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში, ზერელე ნელტალღოვანი ფაზის სიხშირის მკვეთრი მატება წარმოადგენს (სურ.6.ბ.2) და საკონტროლო მოდელების მონაცემებს 2,5-ჯერ აღემატება, რაც ძილის ნორმალური ფუნქციების მოშლას იწვევს და ნეიროდეგენერაციის პროცესს ამძიმებს.

მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის ქრონიკული, 14 დღიანი, გამოყენების შედეგად ზერელე ნელტალღოვანი ძილის სიხშირე ნორმას უბრუნდება, რაც მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის მაღალ ეფექტურობას ადასტურებს (სურ.6.ბ.3).



**სურათი 6. მიკროკაფსულირებული ყწზ-ის ეფექტურობა: ა -დაძინების ფარული პერიოდზე ბ - ზერელე ნელტალღოვანი ძილის სიხშირეზე, ეგ რეგისტრაციის 6 საათიან პერიოდში.**

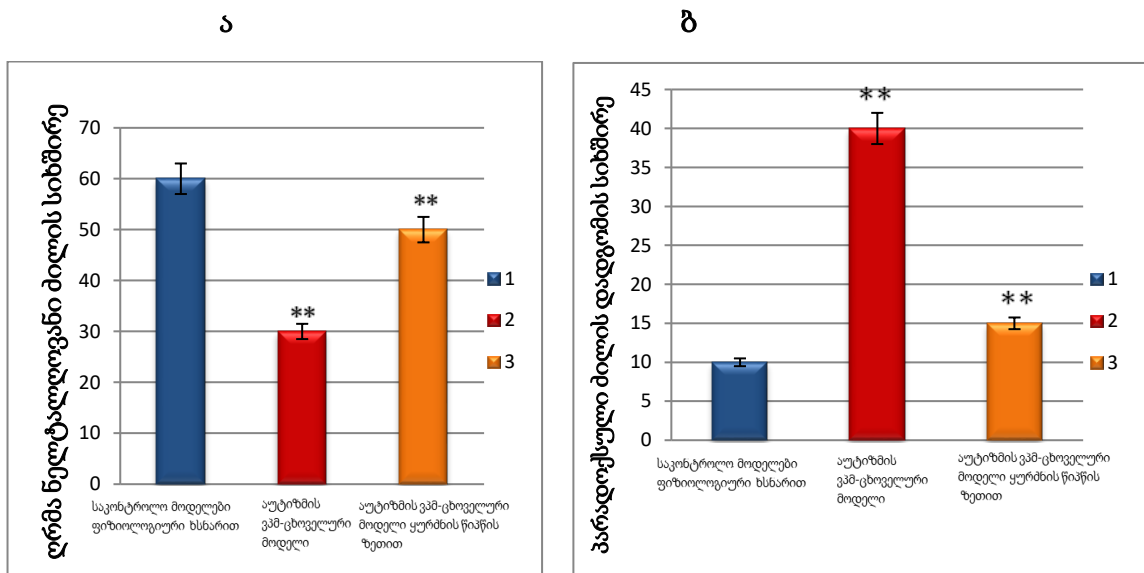
საპირისპირო ცვლილებები ვლინდება ღრმა ნელტალღოვანი ძილის ჩამრთველი მექანიზმების ნორმალური ფუნქციების მოშლის მიმართულებით (სურ.7.ა.2). აღმოჩნდა, რომ აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში მკვეთრად არის შემცირებული ღრმა ნელტალღოვანი ძილის დადგომის სიხშირე. ძილის ეს ფაზა

წყვეტადი ხდება, რაც მნიშვნელოვნად აუარესებს ძილის ხარისხს და მისი ნორმალური, აღდგენითი ფუნქციის შესრულება ვეღარ ხდება.

აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში მკვეთრად კლებულობს ნელტალღოვანი ძილის ცალკეული ეპიზოდების ხანგრძლივობაც და მის ფრაგმენტაციას (30 წმ-მდე ხანგრძლივობის ფრაგმენტებით) აქვს ადგილი, რაც ნელტალღოვანი ძილის აღდგენით ფუნქციას კიდევ უფრო აუარესებს, ვინაიდან ძილის ეს ფაზა, ადამიანებში, თავის აღდგენით ფუნქციას მხოლოდ იმ შემთხვევაში ასრულებს თუკი მისი პირველი და მეორე ეპიზოდის უწყვეტი ხანგრძლივობა, შესაბამისად, 120 – 90 წთ-ს უტოლდება. ვირთაგვებში ეს სიდიდე 15-25 წთ შეადგენს.

განსაკუთრებით მკვეთრი ცვლილებები აღინიშნა პარადოქსული ძილის სიხშირესა და პროცენტულ რაოდენობაში.

აღმოჩნდა, რომ პარადოქსული ძილის ეპიზოდების დადგომის სიხშირე აუტიზმის ცხოველურ მოდელებში საშუალოდ ოთხჯერ აღემატება საკონტროლო ცხოველების მონაცემებს (სურ.7.ბ.2) და უწყვეტი ეგ რეგისტრაციის 6 საათიან პერიოდებში, საშუალოდ, 40-ს გაუტოლდა (სურ.7.ბ.2).



სურ. 7 მიკროკავსულირებული ყწზ-ის ეფექტურობა ა- დრმა ნელტალღოვანი ძილის და ბ - პარადოქსული ძილის დადგომის სიხშირეზე, ეგ რეგისტრაციის 6 საათიან პერიოდში. \*\*= $p < 0.01$

ეს ძალიან სერიოზული ცვლილებებია, ვინაიდან, აღმოჩნდა, რომ აუტიზმის ვკმ-მოდელებში, ძილის უწყვეტი 6 საათიანი ეგ ჩანაწერის მნიშვნელოვან ნაწილს პარადოქსული ძილი იკავებს, რაც თერაპიული თვალსაზრისით, უკიდურესად არასასურველი დარღვევაა.

ბიოდეგრადირებად ფსევდოპროტეინ 8L6-ში მიკროკაფსულირებული ყწზ მაღალ ეფექტურობას პარადოქსული ძილის დარღვევების პრევენციაზეც ახდენს. მისი ქრონიკული გამოყენებისას, ამ ფაზის დადგომის სიხშირე, აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში, მკვეთრად (3-ჯერ) მცირდება და საკონტროლო ფიზიოლოგიური მოდელების მაჩვენებლის ფარგლებს უბრუნდება (სურ.7.ბ.3).

ეს ახალი და ძალიან მნიშვნელოვანი დასკვნაა, ვინაიდან შიშისა და შფოთვის მატება და ძილის დარღვევები აუტიზმის სპექტრის ძალიან მნიშვნელოვანი კომპონენტებია, რომლებიც თავის მხრივ, სხვა სიმპტომების დამძიმებასაც უწყობენ ხელს, ამიტომ მათი მართვა უკიდურესად მნიშვნელოვანი იქნება აუტიზმის სპექტრის დარღვევის პრევენციის მიმართულებით.

ვინაიდან, ყწზ მდიდარია ანტიოქსიდაციური ეფექტის მქონე ნაერთებით, პოლიფენოლებით - უჯერი და ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავებით, სხვა ნაერთებით და მთელი რიგი ვიტამინებით, მისი ეფექტურობა მომატებული შიშისა და შფოთვის შემცირებაში, როგორც ჩანს, სწორედ ამ შემადგენლობის „თაიგულის“ სინერგისტული ანტიოქსიდაციური მოქმედების მექანიზმს ეფუძნება.

## დასკვნა

1. მიღებულ იქნა ახალი, ყწ-ით დატვირთული, სხვადასხვა ფსევდოპროტეინული [8L6-პოლიესტერამიდი, 1L6, ამინომჟავა L-ლეიცინის საფუძველზე და ასევე პოლიესტერმარდოვანას (1L6)<sup>0.8</sup> და პოლიესტერამიდის (8L6)<sup>0.2</sup> თანაპოლიმერი], მიკროკაფსულების ემულსიები.
2. სხვადასხვა, ცვლადი, ფიზიკურ-ქიმიური ფაქტორების გამოყენებით, დადგინდა ყწ-ით დატვირთული, სამი ტიპის მიკროკაფსულების ძირითადი პარამეტრები: საშუალო დიამეტრი, დისპერსიულობა. ოპტიკური მიკროსკოპის გამოყენებით შესწავლილია მიღებული მიკროკაფსულების მორფოლოგია, აგრეგაციის ხარისხი და მიკროკაფსულებში ზეთის ჩართულობის ხარისხი;
3. ყწ-ის ინკაფსულირებისთვის, ჩატარებული კვლევის საფუძველზე, სასურველი თვისებების მქონე ბიოდეგრადირებად კედლის მასალად, ფსევდოპროტეინი 8L6 შეირჩა;
4. კვლევის შესაბამისი ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდების გამოყენებით დადგინდა ყწ-ის ბიოდეგრადირებად კედლის მასალა ფსევდოპროტეინ 8L6-ში ინკაფსულირების ოპტიმალური პირობები;
5. პირველად განხორციელდა ყწ-ის წარმატებული მიკროკაფსულირება, კედლის მასალად ბიოდეგრადირებადი ფსევდოპროტეინის, 8L6-ის, გამოყენებით;
6. დადგინდა ფსევდოპროტეინ 8L6-ში მიკროკაფსულირებული ყწ-ის პრეკლინიკურ კვლევებში გამოყენების უსაფრთხოება;
7. მიკროკაფსულირებული ყწ-ის ანტიოქსიდაციური ეფექტურობის კვლევის მიზნით გამოყვანილ იქნა აუტიზმის ცხოველური მოდელი, ვალპროის მჟავას ადრეული პრენატალური გამოყენებით;
8. ნაჩვენები იქნა, რომ აუტიზმის ვკმ-ცხოველური მოდელების სისხლის პლაზმაში გაზრდილია რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების კონცენტრაცია, რაც აღნიშნული მოდელების ოქსიდაციური სტატუსის დარღვევის მაჩვენებელია;

9. პირველად იქნა ნაჩვენები მიკროკაფსულირებული ყწ-ის მაღალი პრევენციული ეფექტურობა რეაქტიული ჟანგბადის მეტაბოლიტების კონცენტრაციის დარეგულირებაზე აუტიზმის ცხოველური მოდელების სისხლის პლაზმაში;
10. აღწერილ იქნა თანშობილი შიშისა და შფოთვის მკვეთრი მატება აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში;
11. პირველად იქნა ნაჩვენები მიკროკაფსულირებული ყწ-ის მაღალი პრევენციული ეფექტურობა შიშისა და შფოთვის ცვლილებებზე აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში;
12. ნაჩვენები იქნა ძილის სამი ძირითადი ფაზის დარღვევები აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში - ზერელე ნელტალღოვანი ძილის სიხშირის მკვეთრი მატება, ღრმა ნელტალღოვანი ძილის შემცირება, დაფრაგმენტება და გაზერელეება და პარადოქსული ძილის ჭარბი განვითარება;
13. პირველად იქნა ნაჩვენები მიკროკაფსულირებული ყწ-ის მაღალი პრევენციული ეფექტურობა ძილის სამივე ფაზის დარღვევების აღდგენაზე აუტიზმის ვკმ-ცხოველურ მოდელებში.

სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი შედეგები გამოქვეყნებულია შემდეგ სამეცნიერო შრომებში:

1. ხათუნა ბეჟანიშვილი, დარეჯან ხარაძე, თინა ომიამე, თეიმურაზ ბუაჩიძე, ნარგიზ ნაჭყებია. ყურძნის წიპწის ზეთის მიკროკაფსულირება, ბიოდეგრადირებადი ფსევდოპროტეინის - 8L6-ის გამოყენებით. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის მაცნე, ბიომედიცინის სერია, 2023, 49: #1-3 გვ. 23-32
2. Khatuna Bezhanishvili. Evaluation of the efficacy of microencapsulated grape seed oil on changes in anxiety and innate fear in VPA-model of autism. Proceedings of the Georgian National Academy of Sciences, Biomedical Series, 2023, 49: #1-3, p. 13-21
3. Khatuna Bezhanishvili, Neli Maglakelidze, Nino Rogava, Mariam Babilodze, Nargiz Nachkebia. Changes in sleep structure in VPA-model of autism – preventive efficacy of microencapsulated grape seed oil. Proceedings of the Georgian National Academy of Sciences, Biomedical Series, 2023, 49: #4-6, p. 121-130

## Abstract

The goal of the research was to create biodegradable microcapsules for the encapsulation of grape seed oil (GSO) and to study its antioxidant efficiency. The problem is relevant since encapsulation of oils and of GSO, in particular, is the only way to use them in preclinical experimental studies, where the controlled, dosed supply of a quality product is of great importance.

The issue, despite its high relevance, is understudied, despite GSO - is rich in linoleic acid (polyunsaturated fatty acid), and oleic acid (monounsaturated fatty acid), which have been associated with the prevention of various disorders in humans. It has been concluded that fatty acids can be incorporated into food systems to increase their nutritional value and improve beneficial effects on human health.

However, GSO due to the high content of polyunsaturated fatty acids is chemically unstable, susceptible to oxidative degradation and as a result, loses its useful properties. Therefore, in order to preserve GSO as a healthy product, it became necessary to protect it from spoilage during processing, storage and transportation.

Our interest in researching the antioxidative effects of GSO is motivated by several lines of evidence suggesting that immune dysregulation may cause or contribute to the development of autism spectrum disorders (ASD).

The presented research was focused on two main aspects: microencapsulation of GSO, using biodegradable pseudoprotein as wall material, and investigation of possible antioxidant efficacy of safe, controlled, dosed delivery of microencapsulated GSO emulsion in animal models of autism.

The antioxidant efficiency was studied: a) on the content of reactive oxygen metabolites in the blood plasma; b) on sleep disorders and c) on innate fear and anxiety. All three of them are serious problems characteristic of ASD children and adolescents.

Our attention has been focused on biodegradable pseudoproteins, since they are distinguished by a number of features: they release natural amino acids as a result of biodegradation, like proteins; promote cell proliferation and tissue regeneration; because molecular architecture different from natural macromolecules, pseudoproteins are characterized by low immunogenicity.

Therefore, we decided to microencapsulate GSO for the first time, using pseudo protein as wall material, in a form and size that would allow us to inject them in a controlled dose into the vascular plexus of the abdomen (intraperitoneally) and also, by means of syringes, dosed, safe addition of a healthy product in special animal feed.

As a result: pseudoprotein 8L6, a biodegradable wall material with desirable properties, was selected; using appropriate physicochemical methods, the optimal conditions for microencapsulation of GSO in the pseudo protein 8L6 were determined and successful microencapsulation of GSO was performed for the first time; the safety of the use of GSO microencapsulated in pseudo protein 8L6 was established; to study the antioxidant efficiency of microencapsulated GSO, an animal model of autism was developed; there was shown the increased concentration of reactive oxygen in the blood plasma of VPA-animal models of autism, which is an indicator of disturbances of their oxidative status; the high preventive efficiency of microencapsulated GSO on regulating the concentration of reactive oxygen metabolites in the blood plasma was shown for the first time; sharp increase in innate fear and anxiety and the high preventive efficacy of



microencapsulated GSO have been shown in VPA-animal models of autism for the first time; disturbances of three main phases of sleep have been shown in VPA-animal models of autism - a sharp increase in the frequency of light slow-wave sleep, a decrease in deep slow-wave sleep, its fragmentation by frequent awakenings and the excessive development of paradoxical sleep; the high preventive efficacy of microencapsulated GSO on the recovery of above disorders was demonstrated for the first time.

The results of the present study represent a step forward as the study is the first to examine the effectiveness of chronic administration of GSO microencapsulated in the wall material of the biodegradable pseudo protein, 8L6 and prove it. The results are very interesting because, as mentioned above, GSO is rich in compounds with antioxidant effects, and its positive effect seems to be based on this mechanism.

The preclinical results will have practical value for the management and prevention of a number of symptoms of ASD, since the use of microencapsulated GSO as a food supplement in ASD children and adolescents, in the initial period of volunteers, will not create the problem of changing the smell and taste of food and It will allow to deliver dosed safe and quality.

The size of microcapsules (100-150  $\mu\text{m}$ ) is also important because it ensures uniform mixing in food recipes, excluding the mechanical perception as a separate component during use. This is very important, since children with autism spectrum disorders, in addition to stereotyped behaviors, according to specific periods, also have a preference for concrete food, so a nutritional supplement should not cause a disruption in their routine.