მურთაზაშვილი თ.[1],სივსივაძე კ.[1],ბოკუჩავა ნ.[1], მასიუკოვიჩი თ.[1], მითაგვარია ნ.[2]

„კამელინი"-ს ანტიოქსიდაციური აქტივობის შესწავლა IN VIVO ექსპერიმენტში

თსსუ, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი;[1] ივანე ბერიტაშვილის სახელობის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრი[2]

გასული საუკუნის 50-იან წლებში ექიმ ბენედიქტე მაღლაკელიძის მიერ ნატურალური თაფლიდან მიღებული იქნა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებით მდიდარი ფრაქცია, რომელსაც ავტორი იკვლევდა ცხოველებზე და შემდგომ იყენებდა სამკურნალოდ პაციენტებზე დამწვრობის, ჩირქოვანი ჭრილობების და სიმსივნის დროს. (გამოყოფილ ფრაქციას ეწოდა „კამელინი" ავტორის გარდაცვალების გამო კვლევები შეჩერებული იყო გარკვეული დროით.

2004-06 წლებში „კამელინი"-ს სუბსტანციაზე შემუშავებული იქნა ანტიმიკრობული და იმუნომამოდულირებელი მოქმედების სამი წამლის ფორმა: საინიექციო ხსნარი ამპულებში(M1), კაფსულა(M2) და მალამო (M3). აღნიშნული პრეპარატები 2006 წელს დარეგისტრირდა ქართულ ფარმაცევტულ ბაზარზე. „კამელინი"-ს ბიოლოგიურ აქტივობაზე კვლევები გრძელდებოდა სხვა მიმართულებითაც და შემუშავდა სხვა წამლის ფორმები; სუპოზიტორია (M4) და ყელის სპრეი(1).

უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიურ პროცესებში ჰიპეროქსიდაცია უარყოფით გავლენას ახდენს ქსოვილებზე, მატულობს ზეჟანგვითი პროცესების შედეგად მიღებული თავისუფალი რადიკალების კონცენტრაცია. ორგანიზმში თავისუფალი რადიკალების ბალანსს და მოქმედებას აკონტროლებს ფერმენტული ანტიოქსიდანტური სისტემები და ეგზოგენური და ენდოგენური ანტიოქსიდანტები. რეგულაციის სისტემის დარღვევა იწვევს უჯრედებისა და ქსოვილების შეუქცევად დაზიანებებას, რის საბოლოო შედეგს წარმოადგენს ორგანოებისა და მთლიანად ორგანიზმის პათოლოგიები (3). ამ კასკადური მექანიზმის შესაჩერებლად სულ უფრო დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ნივთიერებების ჯგუფს, რომლებიც უჯრედის დონეზე ამცირებენ ჰიპეროქსიდაციის პროცესს და ამით იცავენ უჯრედს დაზიანებისაგან. ამ ჯგუფის ნივთიერებებს ანტიოქსიდანტები ეწოდება. არსებობს ბუნებრივი და სინთეზური ანტიოქსიდანტები. ბუნებრივი ანტიოქსიდანტები გავრცელებულია მცენარეულ და ცხოველურ ნედლეულში და ხშირია საკვებ პროდუქტებშიც (2).

საყოველთაოდ ცნობილია თაფლის სამკურნალო თვისებები, რომელშიც წამყვან როლს მისი ანტიოქსიდანტური თვისებები განსაზღვრავს. ბენედიქტე მაღლაკელიძის მიერ ნატურალური თაფლიდან გამოყოფილი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ჯამი -„კამელინი" ხასიათდება მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობით, რომელიც ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა *in vitro* ექსპერიმენტებით DPPH რეაქტივის გამოყენებით სპექტროფოტომეტრული მეთოდით (4).

კვლევის მიზანს შეადგენდა „კამელინი"-ს სუბსტანციის ანტიოქსიდაციური აქტივობის შესწავლა in vivo ექსპერიმენტში.

შპს „კამელინი"-სა და ბიოსამედიცინო კვლევათა ხელშემწყობი ასოციაცია „ბიომედ"-ს შორის 2021წლის 15 ივნისს შედგა შეთანხმება ორმხრივი ხელშეკრულების სახით, რომლის თანახმად, საერთაშორისო სტანდარტების მიხედვით(5) „ბიომედში" ჩატარდებოდა „კამელინი"-ს სუბსტანციის ანტიოქსიდაციური აქტივობა in vivo ექსპერიმენტებში - თეთრ ვირთაგვებზე.

ზრდასრული მამრ ლაბორატორიულ ვირთაგვებს (n=18, წონა 250-350 გ.) ერთი კვირის განმავლობაში ათავსებდნენ ოთახის ტემპერატურაზე, სინათლე/სიბნელის 12/12 ციკლის და საკვებისა და წყლისადმი შეუზღუდავი (*ad libitum)* წვდომის პირობებში.

ვირთაგვები დაიყო სამ ჯგუფად:

- **ჯგუფი 1:** საკონტროლო ჯგუფი (6 ვირთაგვა) - WBH (მთელი სხეულის ჰიპერთერმია) - 1 საათი 43°C-ზე 4 დღის განმავლობაში. შემდეგ 8 დღე ოთახის ტემპერატურაზე წყალზე შეუზღუდავი წვდომით;
- **ჯგუფი 2:** (6 ვირთაგვა) WBH - 1 საათი 43°C-ზე 4 დღის განმავლობაში. შემდეგ 8 დღე ოთახის ტემპერატურაზე „კამელინ"-ის 1:10 განზავებულ წყალხსნარზე შეუზღუდავი წვდომით;
- **ჯგუფი 3:** (6 ვირთაგვა) 8 დღე შეუზღუდავი წვდომით „კამელინ"-ის 1:10 განზავებულ წყალხსნარზე. შემდეგ WBH - 1 საათი 43°C ტემპერატურაზე 4 დღის განმავლობაში.

სურათი №1. ვირთაგვების საკონტროლო ჯგუფი

სურათი №2.ვირთაგვების საცდელი ჯგუფი

სითბური სტრესის გამოწვევა მოხდა ვირთაგვების მოთავსებით თბოკამერაში კონტროლირებადი ტემპერატურით (41±0.5°C) 1 საათის განმავლობაში.

სამივე ჯგუფში თითოეული ექსპერიმენტული ცხოველისთვის ოქსიდაციური სტრესის სტატუსი გაანალიზდა d-ROM-ის და PAT ტესტის გამოყენებით FRAS-5 აპარატზე.

FRAS-5 არის ფოტომეტრი, განკუთვნილი მხოლოდ ბიოლოგიურ სისტემებში ოქსიდაციური სტრესის შეფასებისთვის. კვლევის წარმართვის ძირითადი პრინციპი ეფუძნება კიუვეტში მოთავსებული ხსნარის ნიმუშის შთანთქმის გაზომვას მონოქრომატული სინათლის სხივის მეშვეობით; შთანთქმის მაჩვენებლის მიღების შემდეგ აპარატი ავტომატურად უზრუნველყოფს კონვერტაციას შესაბამის საზომ ერთეულებად ინტეგრირებული პროგრამული უზრუნველყოფის საშუალებით.

d-ROMs (ჟანგბადის აქტიური მეტაბოლიტები) არის სწრაფი ფოტომეტრული ტესტი, რომელიც საშუალებას იძლევა ჰიდროპეროქსიდების კონცენტრაციის (ROOH) გაზომვით შეფასდეს პროოქსიდანტური სტატუსი ბიოლოგიურ ნიმუშში. d-ROMs ტესტი იყენებს ფენტონის რეაქციის პრინციპს: ბიოლოგიური ნიმუშის მჟავა ბუფერთან (რეაგენტი R1) შერევით წარმოქმნილი გარდამავალი ლითონის იონი (რკინა ან სპილენძი) ახდენს ჰიდროპეროქსიდების დაშლას, წარმოქმნის ახალ რადიკალებს, როგორიცაა ჰიდროპეროქსილის ROO* და ალკოქსილის (RO*) რადიკალები. ამ ნიმუშში ქრომოგენის (N, N-დიეთილ-პარაფენილენდიამინი, რეაგენტი R2) დამატებით, რომელსაც აქვს უნარი გასცეს ელექტრონი და შეცვალოს მისი ფერი თავისუფალი რადიკალების მიერ დაჟანგვის დროს, შესაძლებელი ხდება ნიმუშში არსებული ჰიდროპეროქსიდების რაოდენობის განსაზღვრა ფოტომეტრული წამკითხავით, რომელიც ინტეგრირებულია FRAS-5-ში.

PAT ტესტი (პლაზმის ანტიოქსიდანტური პოტენციალი) არის ავტომატური ტესტი, რომელიც აფასებს პლაზმის ანტიოქსიდანტურ პოტენციალს რკინის შემცირების გაზომვით. რკინის და რკინის იონების შემცირება დაბალ pH-ზე იწვევს ფერის ცვლილებას, რომელიც შეიძლება ფოტომეტრულად შეფასდეს ინტეგრირებული ანალიზური მოწყობილობის FRAS-5 გამოყენებით. PAT ტესტის დროს, მცირე რაოდენობით პლაზმა (10µl) ემატება ფერად ხსნარს, რომელიც მიიღება რკინის იონების წყაროს (რეაგენტი R2- FeCl3 რკინის ქლორიდი) შერევით ქრომოგენთან (რეაგენტი R1 - ქრომოგენური ნარევი, რომელიც შეიცავს თი-ოციანატს). 37^{0}C-ზე გატარებით 1 წუთის შემდეგ, ხსნარი შეიცვლის ფერს და ამ ქრომატული ცვლილების ინტენსივობა პირდაპირპროპორციული იქნება პლაზმის უნართან, გარდაქმნას რკინა (III) იონები რკინა (II) იონებად. გაუფერულების ინტენსივობის ფოტომეტრული შეფასებით, შემცირებული რკინის (III) იონების რაოდენობა შეიძლება ადეკვატურად შეფასდეს, რაც შესაძლებელს გახდის ეფექტურად შეფასდეს სისხლის პლაზმის ნიმუშის რკინის შემამცირებელი უნარი, ან ანტიოქსიდანტური შესაძლებლობები. FRAS-5-ის ტესტების საზღვრები მოცემულია ცხრილში №1.

ცხრილი №1. FRAS-5-ის ტესტების საზღვრები

OBRI Index შესადარებელი მაჩვენებელი	
0,8 - 1,2	ნორმა
1,3 - 1,7	მაღალი
1,8 - 2,2	ძალიან მაღალი
>2,2	ექსტრემალურად მაღალი

d-ROMs test შესადარებელი მაჩვენებელი	
250-300	ნორმალური დიაპაზონი
300-320	ზღვრული მაჩვენებელი
321-340	ოქსიდაციური სტრესის დაბალი დონე
341-400	ოქსიდაციური სტრესის საშუალო დონე
401-500	ოქსიდაციური სტრესის მაღალი დონე
>500	ოოქსიდაციური სტრესის ძალიან მაღალი დონე
საზომი ერთეული U. Carr 1 U. Carr = 0.08 mg H2O2/dl	

PAT test შესადარებელი მაჩვენებელი	
>2800	ძალიან მაღალი მაჩვენებელი
2200– 2800	ნორმალური მაჩვენებელი
2200– 2000	დაბალი დიაპაზონის ზღვრული მაჩვენებელი
2000– 1800	უმნიშვნელო დეფიციტური სტატუსი
< 1800	დეფიციტური სტატუსი
საზომი ერთეული U. Cor 1 U. Cor = 1.4 µmol/L of ascorbic aci	

სურათი N3. თავისუფალი რადიკალების საანალიზო სისტემა FRAS-5

სისხლის ნიმუშების შეგროვება

კვლევის დაწყების წინ ექსპერიმენტულ ცხოველებში გამოიყენებულ იქნა ანესთეზია 1მლ 4%/100გრ ქლორალჰიდრატით. სისხლის ნიმუშები შეგროვდა ზედა ღრუ ვენიდან და პლაზმის სეპარაციისათვის დაცენტრიფუგირდა FRAS-5-ში ინტეგრირებული ცენტრიფუგის საშუალებით.

თითოეული ცხოველის ოქსიდაციური სტრესის სტატუსი გაანალიზდა FRAS-5-ის ნაკრების გამოყენებით. შედეგები მოცემულია ცხრილებში (№№2,3).

ცხრილი №2. „კამელინი"-ს (განზავებული წყლით 1:10) ფონზე თითოეული ცხოველის ოქსიდაციური სტრესის სტატუსის მონაცემები

	Rat №	d-ROMs FAST UCarr	PAT U Cor.	OBRI	OSI REDOX
№1 საკონტროლო ჯგუფი WBH - 43°C-ზე 1სთ-იანი 4 დღე, 8 დღე H2O (მონაცემები აღებულია მე-13 დღეს)	1	350	2384	1.3	45
	2	368	2564	1.3	53
	3	735	2379	2,8	263
	4	892	2709	2,9	352
	5	323	3055	0,9	28
	6	332	2618	1,1	32
№2 ექსპერ. ჯგუფი WBH - 43°C-ზე 1სთ-იანი 4 დღე, 8 დღე კამელინი (მონაცემები აღებულია მე-13 დღეს)	1	361	2480	1,3	49
	2	291	2333	1,1	21
	3	758	3034	2,2	276
	4	356	2618	1,2	46
	5	268	2939	0,8	6
	6	275	2552	0,9	3
№3 ექსპერ. ჯგუფი 8 დღე კამელინი, WBH - 43°C-ზე 1სთ-იანი 4 დღე (მონაცემები აღებულია მე-13 დღეს)	1	286	2343	1,1	20
	2	263	2580	0,9	7
	3	275	2842	0,8	1
	4	496	2580	1,7	126
	5	675	2379	2,5	229
	6	290	2333	1,1	21

ცხრილი №3. „კამელინი"-ს (1:10 წყლით განზავებული) ფონზე n o ექსპერიმენტში ოქსიდაციური სტრესის სტატუსის საშუალო მონაცემები

	d-ROMs FAST UCarr	PAT U Cor.	OBRI	OSI REDOX
ინტაქტური	222±10,3 Normal range	2364±134 Normal val e	0,8±0,07 Normal	36±6,9 Normali
№1 საკონტროლო ჯგუფი WBH 43°C ზე 1 სთ-იანი 4 დღე, 8 დღე H2O	343±17,3 Middle level of o ida ive s ress	2655±157,4 Normal val e	1,2±0,2 Normal	40±10 Normali
№2 ექსპერ. ჯგუფი WBH - 43°C-ზე 1სთ-იანი 4 დღე, 8 დღე კამელინი	310±40,2 Border condi ion	2584±201 Normal val e	1,1±0,2 Normal	25±19,4 Normali
№3 ექსპერ. ჯგუფი 8 დღე კამელინი, WBH - 43°C-ზე 1სთ-იანი 4 დღე	279±10,5 Normal range	2552±208 Normal val e	1,0±0,1 Normal	12±8,5 Normali

კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ თავისუფალი რადიკალების საერთო შემცველობა მნიშვნელოვნად მაღალი იყო საკონტროლო ჯგუფში, ვიდრე იმ ჯგუფებში, რომლებმაც მიიღეს კამელინი. აღსანიშნავია, რომ მე-3 ჯგუფმა, რომელიც კვლევის დასაწყისში 8 დღის განმავლობაში იღებდა კამელინს და მხოლოდ ამის შემდეგ მოათავსეს მაღალი ტემპერატურის კამერაში, აჩვენა უკეთესი შედეგი ოქსიდაციურ სტრესთან „გამკლავებაში" და პირველ 2 ჯგუფთან შედარებით განუვითარდა გაცილებით ნაკლები თავისუფალი რადიკალი.

მეცნიერულად დადასტურებულია, რომ ოქსიდაციური სტრესი და თავისუფალი რადიკალები საზიანოა ადამიანის ჯანმრთელობისთვის. კვლევების დიდი რაოდენობა ცხადყოფს, რომ რეალურად თავისუფალი რადიკალები ხელს უწყობს სხვადასხვა პათოლოგიის განვითარებასა და პროგრესირებას. ანტიოქსიდანტებმა, როგორც ნაერთების კლასმა, რომელსაც შეუძლია წინააღმდეგობა გაუწიოს ოქსიდაციურ სტრესს და შეამსუბუქოს მისი გავლენა ინდივიდის ჯანმრთელობაზე, მიიპყრო ბიოსამედიცინო კვლევითი საზოგადოების ყურადღება, რადგან ამ ნაერთებმა არა მხოლოდ აჩვენეს ეფექტურობის მაღალი ხარისხი დაავადების პრევენციისა და/ან მკურნალობის თვალსაზრისით, არამედ გამოავლინეს გვერდითი ეფექტების განვითარების მნიშვნელოვანი დაბალი მაჩვენებელი.

ლიტერატურა:

2. ბერაშვილი დ.,გონაშვილი მ.,ჭუმბურიძე ბ. - ზოგიერთი ქართული ღვინის ანტიოქსიდანტური აქტივობის შესწავლა//საქ. ქიმიური ჟურნალი, 2006, 6(5), 45-4 .

3. Mandic A., D ilas S., Canadanovic-Br ne . – An io- sidan a ivi of i e grape seed e s rac s on DPPH radicals//APT FF, 2009, 40, 1-220

4. თ. მურთაზაშვილი, მ.ჯოხაძე, ბ. ნოზაძე, თ. მასიუკოვიჩი, კ.სივსივაძე - კამელინის პრეპარატების ანტიოქსიდანტური აქტივობის შესწავლა// ექსპერიმენტული და კლინიკური მედიცინა, N1. 2013

5. Hea -ind ced o ida ive s ress and inflamma ion in ra s in rela ion o age ovana Ilievs a1, i or Cicimov1, mili a An ova2, Ic o orgos i1, Ni ola Had -Pe r s ev1, Mi o Mladenov1 2016, ol. 5, No. 2, pp.123-130 ISSN(Prin 1857-8152 ISSN(Online 1857-8160

SUMMARY

M rta as T.[1] S s ad e K.[1] Bo a a N.[1]
Mas o T[1] M ta ar a N.[2]

TSMU DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL AND TOXICOLO ICAL CHEMISTRY[1] IVANE BERITASHVILI CENTER OF EXPERIMENTAL BIOMEDICINE[2]

T e ealing proper ies of one are ell no n, in ic an io idan ac ivi pla s a ma or role. T e s m of biologicall ac ive s bs ances e rac ed from na ral one b Benedic Mag la elid e- Camelin is c arac eri ed b ig an io idan ac ivi . T e aim of o r s d as o s d e an io idan ac ivi of e s bs ance Camelin in an in vivo e perimen .

On ne 15, 2021, a bila eral agreemen as signed beeen Camelin L d. and Biomed , e Associa ion for e Promo ion of Bio-Medical Researc es, According o ic , Biomed o ld carr o e an io idan ac ivi of e s bs ance Camelin in *in vivo* e perimen s - on i e ra s.

Ad 1 male labora or ra s (n=18, eig 250–350 g ere placed a room empera re for one ee , 12/12 c cles of lig / dar ness, and *ad libitum* access o food and a er.

Ra s ere divided in o ree gro ps

ro N1 Con rol gro p (6 ra s - WBH - 1 o r a 43°C for 4 da s. T en 8 da s a room empera re i nres ric ed access o a er

ro N2 (6 ra s WBH - 1 o r a 43°C for 4 da s. T en for 8 da s i nres ric ed access o 1 10 dil ed a e o s sol ion of Camelin a room empera re

ro N3 (6 ra s 8 da s i nlimi ed access o 1 10 dil ed a eo s sol ion of Camelin. T en WBH - 1 o r a 43°C for 4 da s.

Hea s ress as ind ced b placing ra s in a empera re-con rolled c amber (41 ± 0.5°C for 1 . O ida ive s ress s a s for eac e perimen al animal in all ree gro ps as anal ed sing d-ROM and PAT es on FRAS-5.

T e res l s of e s d s o ed a e o al con en of free radicals as significan l ig er in e con rol gro p an in e gro ps a received Camelin. I is no e or a e 3rd gro p, ic oo Camelin for 8 da s a e beginning of e s d and onl en, as placed in a ig empera re c amber, s o ed be er res l s in dealing i o ida ive s ress and developed m c fe er free radicals an e firs 2 gro ps.