



ბენზოილის ზეჟანგის შემცველი ბიონანოკომპოზიტები ფსევდოპროტეინების საფუძველზე

დარეჯან ხარაძე¹, თინა ოშიაძე¹, ლარისა ყირმელაშვილი¹, თემურ ქანთარია², რამაზ ქაცარავა²

¹ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრი, თბილისი 0160, გოთუას ქ. 14, საქართველო; ²ქიმიისა და მოლეკულური ინჟინერიის ინსტიტუტი, საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი, კახა ბენდუქიძის საუნივერსიტეტო კამპუსი, თბილისი 0159, დავით აღმაშენებლის ხეივანი # 240, საქართველო;

აბსტრაქტი:

ახალი ბიოსამედიცინო ტექნოლოგიების შემუშავება მედიცინაში მკურნალობის ახალი მეთოდების დანერგვის შესაძლებლობას იძლევა. მათ შორის ერთ-ერთი საინტერესო და პერსპექტიულია ზეჟანგების ან/და ჟანგბადის კონტროლირებადი, მდგრადი პროლონგირებული) გამოყოფისა და მიწოდების ტექნოლოგია ჰიპოქსიის მკურნალობისათვის, უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობისა და ქსოვილების ფუნქციების გასაუმჯობესებლად. ოქსიგენაციის გაზრდას მრავალი დაავადება თუ სამედიცინო პროცედურა საჭიროებს. ჟანგბადის მიწოდებას შეუძლია შეამციროს უჯრედების აპოპტოზი, ნეკროზი და ქსოვილების ფორმირების წარუმატებლობა (განსაკუთრებით ტრანსპლანტაციისას).

წარმოდგენილი ნაშრომი ეძღვნება ახალი სტრუქტურის ჟანგბადის მიწოდების უნარის მქონე კომპოზიტების მიღებას ფსევდოპროტეინების საფუძველზე. ჩვენს მიერ ადრე სინთეზირებულ მრავალრიცხოვან ფსევდოპროტეინებს შორის შევარჩიეთ პოლიესტერამიდური კლასის ორი პოლიმერი აბრევიატურით **4F4** და **8L6**, ბუნებრივი α -ამინომჟავების - ფენილალანინისა და ლეიცინის საფუძველზე (იხ. სქემა 1 ქვემოთ) და მათი გამოყენებით მივიღეთ და დავახასიათეთ ბენზოილის ზეჟანგის შემცველი ნანოკომპოზიტები. შევისწავლეთ სხვადასხვა ფაქტორების გავლენა ნანოკომპოზიტების ფორმირებაზე, ასევე მათი მდგრადობა შენახვისას.

საძიებო სიტყვები: ფსევდოპროტეინები, ნანოკომპოზიტები, ბენზოილის ზეჟანგი, ჟანგბადის გამოყოფის სისტემები;

შესავალი:

ჟანგბადის *in situ* გენერაციის უნარის მქონე მასალების გამოყენება ჰიპოქსიის მკურნალობის პერსპექტიული მეთოდია. ჟანგბადი უჯრედის შეუფერხებელი ფუნქციონირებისთვის ერთერთი მნიშვნელოვანი ნივთიერებაა. იგი გამოიყენება როგორც თერაპიული აგენტი უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობისა და ქსოვილების ფუნქციის გასაუმჯობესებლად. ჰიპოქსია ვითარდება იშემიის, ტრამვების, ანემიის, მოწამლვის, ქირურგიული ჩარევების, იმპლანტაციისას და სხვ. შედეგად. ძირითადი წინააღმდეგობა ქსოვილების ინჟინერინგში, განსაკუთრებით მაღალი მეტაბოლიზმის უჯრედების იმპლანტაციისას, მდგომარეობს არასაკმარის ოქსიგენაციაში, რაც იწვევს მათ დისფუნქციას, აპოპტოზს ან ნეკროზს.

ჟანგბადის გენერაცია *in situ* შესაძლებელია აირადი ჟანგბადის, ჟანგბადით მდიდარი ნაერთების (მაგალითად, ზეჟანგების), ასევე მათი კომპოზიტების გამოყენებით. აღნიშნული პროცესის განხორციელება აირადი ჟანგბადის გამოყენებით შემდეგ

β-ციკლოდექსტრინის ნანოღრუბელ/ჰიდროგელის კომბინირებული სისტემის გამოყენებით [1]. მიღებული სისტემები გამოსცადეს *in vitro*, ნანოღრუბლის უსაფრთხოება კი Ver0-ს (თირკმელი) უჯრედებზე. მიღებული შემაღგენლობა სავარაუდოდ გამოსადეგი უნდა იყოს ჟანგბადის მიწოდების პოტენციური სისტემის სახით, თუმცა ამ შემთხვევაში გამოყოფის პროცესის (ჟანგბადის) კონტროლი საკმაოდ რთული აღმოჩნდა.

ჟანგბადის მიწოდების მიზნით უშუალოდ მყარი ზეჟანგების გამოყენება იწვევს ჰიპეროქსიურ მდგომარეობას და ჰიდროქსილის (OH⁻) რადიკალების დაგროვებას სწრაფი ჰიდრატაციის გამო. უფრო პერსპექტიულად გვესახება ჟანგბადის მიწოდებისათვის მყარი ზეჟანგების შემცველი კომპოზიტების გამოყენება [2], რაც მოიცავს ზეჟანგების ან მათი ნაწარმების ბიოკომპოზიტში ჩართვას ისე, რომ შესაძლებელი იყოს მათი გამოთავისუფლება სასურველ გარემოში და კონტროლირებადი სიჩქარით. ჟანგბადის წყაროდ შესაძლებელია როგორც ორგანული, ასევე არაორგანული ზეჟანგების გამოყენება.

ორგანული ზეჟანგებიდან სამედიცინო მიზნებისათვის პერსპექტიულია ბენზოილის ზეჟანგი. მისი ინკაფსულირება განახორციელეს [3] ცხიმოვანი მჟავების მარილების გამოყენებით და მიიღეს ნანონაწილაკები ზომით ≤ 10 მკმ. ბენზოილის ზეჟანგის მიკროზომის კომპოზიტები მიიღეს ეთილცელულოზას საფუძველზე [4]. განახორციელეს ასევე ბენზოილის ზეჟანგის და ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის ინკაფსულირება ლიპოსომაში [5]. შევნიშნავთ, რომ ერთზე მეტი აქტიური ფარმაკოლოგიური ინგრედიენტის ინკაფსულირება ნანო ან მიკროზომის კონტეინერებში მიმზიდველი მიდგომაა წამლების სინერგიული ეფექტის მიღწევისა და რამდენიმე სამკურნალო პრეპარატით მკურნალობისას დოზირების ნაკლებად რთული სქემების განხორციელებისათვის. აღწერილია წყლიან არეში (მაგალითად, პაციენტის სხეულში ან სისხლის მიმოქცევის სისტემაში) არაორგანული ზეჟანგების საფუძველზე

მიღებულია ჟანგბადის კონტროლირებადი და პროლონგირებული გამოყოფის კომპოზიტები [6]. ინკაფსულირებისათვის გამოყენებულია წყალბადის, კალციუმის, თუთიის, ნატრიუმის, მაგნიუმის ზეჟანგები. მოახდინეს ზეჟანგების დისპერგაცია მათი სუსპენდირებით ჰიდროფობურ, პერფორირებულ ნაერთებში, მაგალითად, პერფორირებულ ჰეპატომაში. სუსპენდირებული ზეჟანგები გამოსცადეს ინკაფსულირებული ღვიძლის (HepG2) [7] და β TC-tet ინსულინომის უჯრედებისათვის [8], რბილი ქსოვილების ვასკულარიზაციისათვის მათი ტრამვირებისას [9].

ქსოვილურ ინჟინერიაში ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი გამოწვევაა სისხლძარღვების ჩამოყალიბებამდე 3D სკაფოლდში ჩართული უჯრედების გადარჩენა. წყალბადის ზეჟანგის პერფტოროქტანში ემულსიფიცირებული მიკრონაწილაკები (PFO-HP) გამოსცადეს [10] როგორც *in vitro* უჯრედების კულტურაში, ასევე ექსპერიმენტში *in vivo*. დაადგინეს, რომ PFO-HP-ებზე დათესილი უჯრედები ინარჩუნებდნენ სიცოცხლისუნარიანობას 10 დღის განმავლობაში სისხლძარღვების ინფილტრაციამდე. უაღრესად პერსპექტიულია ზეჟანგების ჩართვა ბიოდეგრადირებად მიკროკონტეინერებში. არაორგანული ზეჟანგების (წყალბადის, Ca, Mg ზეჟანგები, ნატრიუმის პერკარბონატი) ინკაფსულირებისთვის ბიოდეგრადირებად კონტეინერებად (მატრიქსად) უმეტესწილად გამოიყენება პოლი(D,L-ლაქტიდ-გლიკოლიდი) (PLGA), ასევე ჟელატინი და ქიტოზანი [11-15]. მიღებული პრეპარატები გამოიყენეს იშემიურ ქსოვილებში აპოპტოზის შემცირებისათვის [11,12], სამგანზომილებიანი კონსტრუქციის ფოროვან კარკასებში [12-14] მიოკარდიუმის ინფარქტით დაზიანებული გულის ქსოვილის ღეროვანი უჯრედებით რეგენერაციისათვის [15], ოსტეოგენური დიფერენციაციისა და ძვლოვანი ქსოვილის ინჟინერიისთვის [16]. ყველა შემთხვევაში შედეგი დადებითი იყო, თუმცა ჟანგბადის გამოყოფის კინეტიკა ნაკლებად კონტროლირებადი აღმოჩნდა PLGA-ს სწრაფი ჰიდროლიზური დეგრადაციის გამო. გარდა ამისა პრეპარატების ციტოტოქსიკურობის შემცირებისთვის საჭირო აღმოჩნდა ფერმენტ კატალაზას დამატება, ჭარბი ზეჟანგის დასაშლელად [17].

PLGA/MgO₂ მიკროსფეროებით დატვირთული თიოლირებული ალგინატ (AlgT)/ჟელატინის მეტაკრილოილის ჰიდროგელი, მიღებული ფოტოშეკერვის კლიკრეაქციით [16] ეფექტური აღმოჩნდა ოსტეოგენური დიფერენციაციისა და ძვლოვანი ქსოვილის ინჟინერიისთვის. Ca²⁺-ით შეკერილი კალციუმის ზეჟანგის შემცველი ალგინატის ჰიდროგელზე ძვლის ტვინის მეზენქიმური სტრომალური უჯრედების კულტივირებით [18] მიიღეს უჯრედების ზრდისა და ქსოვილის რეგენერაციის გაუმჯობესება. ძვლოვანი ქსოვილის რეგენერაციის დამატებით პოტენციალს ჰიდროგელს ანიჭებდა Ca²⁺ იონების გამოყოფა.

მატრიქსად პოლილიზინის, პოლიაკრილამიდის, პოლიმეტაკრილატის, პოლიესტერის, პოლიურეთანის, ნაილონის, გაკერილი დექსტრანის და არაჟელირებადი პოლისაქარიდის გამოყენებით შექმნილია [19] წყალბადის, ამონიუმის, ნატრიუმის ზეჟანგის, მათ შორის აირადი ჟანგბადის შემცველი კომპოზიტები (ფირების და

ჰიდროგელების სახით). ეს კომპოზიტები გამოიყენეს უშუალოდ ჭრილობაში ჟანგბადის მიწოდების მიზნით.

მიღებულია [20] პოლიდიმეთილსილოქსანში (PMDS) ინკაფსულირებული კალციუმის ზეჟანგის კომპოზიტი PDMS-CaO₂ (ფირები), რომლებიც გამოყოფდნენ ჟანგბადის 0.026 მმოლი/24 სთ სიჩქარით და ერთ კვირაზე მეტი გამოყოფის პერიოდით. ფირების აქტიურობა შეისწავლეს ვირთაგვების β-უჯრედებსა და პანკრეასის კუნძულებზე. ვარაუდობენ მიღებული მიღწევების განვრცობას სხვა სახის იმპლანტირებულ უჯრედებსა და იშემიურ ქსოვილებზე.

აღწერილია წყალბადის ზეჟანგით დატვირთული პოლიმეთილმეტაკრილატის მიკროკაფსულები (ზომით 5-30 მკმ) [21], რომლებიც მიიღეს ე.წ. ზეთი/წყალი ემულსიფიკაციის მეთოდით. მიკროკაფსულებიდან ზეჟანგის 70% გამოიყო 24 საათის განმავლობაში. შენახვისას მიკროკაფსულები ინარჩუნებენ ჩატვირთული ზეჟანგის 84% 10 თვის განმავლობაში 2-8 °C-ზე, რაც მნიშვნელოვანია მათი კლინიკური გამოყენების თვალსაზრისით. მიღებული მიკროკაფსულები პერსპექტიულია პროლონგირებული მოქმედების ანტიმიკრობული აგენტების სახით.

პაროდონტიტის სამკურნალდ (რომლითაც დაავადებულია მსოფლიოს მოსახლეობის 50%-80%), გამოიყენეს 1.7% წყალბადის ზეჟანგის და ვიზრამინის შემცველი გელი პოლოქსამერ-407-ის საფუძველზე (Perio Gel), რომელიც თავსდება პაროდონტულ ჯიბეში [22. აქვე ინტერესს მოკლებული არ იქნება შევნიშნოთ, რომ გარდა სამედიცინო მიზნებისა, ჟანგბადის მიწოდების კომპოზიტები მნიშვნელოვანია გარემოს დაცვის - ბიორემედიაციისათვის in situ [23].

გაწეული ძალისხმევის მიუხედავად, დღეისათვის პრობლემად რჩება ორგანიზმისთვის ჟანგბადის უსაფრთხო, კონტროლირებადი და მდგრადი (უწყვეტი) მიწოდება. ყოველივე ზემოაღნიშნულის გათვალისწინებით მიზნად დავისახეთ მიგველო ბენზოილის ზეჟანგის კომპოზიტები ჩვენს მიერ ადრე სინთეზირებული ბიოდეგრადირებადი, α-ამინომჟავური ბიომიმეტიკების - ფსევდოპროტეინების [24,25] გამოყენებით, დაგვედგინა მათ მიერ ნანოკონტეინერების წარმოქმნის პირობები და შეგვესწავლა მიღებული ნაწილაკების მახასიათებლები და მდგრადობა.

ექსპერიმენტული ნაწილი მასალები და მეთოდები

PEA-ები დავასინთეზეთ სამი საშენი ბლოკისგან, როგორებიცაა α-ამინომჟავები, დიოლები და ალიფატური დიკარბოქსილის მჟავები. კვლევაში გამოვიყენეთ ორი α-ამინომჟავა - L-ფენილალანინი (F) და L-ლეიცინი (L), ორი დიოლი - 1,4-ბუტანდიოლი (4) და 1,6-ჰექსანდიოლი (6), და ორი დიაცილდიქლორიდი - ადიპოილქლორიდი და სებაცილქლორიდი (გამოვიყენეთ გააქტიურებული დი-პ-ნიტროფენილ დიესტერების მისაღებად). სხვა ქიმიკატები და გამხსნელები იყო: p-ტოლუოლსულფომჟავას მონოჰიდრატი, პ-ნიტროფენოლი, N,N-დიმეთილ-ფორმამიდი (დმფ), დიმეთილსულფოქსიდი (დმსო), აცეტონი, ბენზოლი, ეთილაცეტატი, ტრიეთილამინი

და პირიდინი. ყველა გამხსნელი და მესამეული ამინები გამოყენებამდე გაიწმინდა სტანდარტული მეთოდებით, ხოლო სხვა ქიმიკატები, როგორცაა β -ტოლუოლსულფომჟავას მონოჰიდრატი, p -ნიტროფენოლი, α -ამინომჟავები, დიოლები და დიკარბოქსილის აცილქლორიდები, ბენზოლის ზეჟანგი (ზზ), არაიონური ზედაპირულად აქტიური ნივთიერებები (ზან) Tween-20 და Tween-40 (ყველა Sigma-Aldrich) გამოვიყენეთ შემდგომი გაწმენდის გარეშე.

მონომერების სინთეზი

ფსევდოპროტეინებისთვის საჭირო ბის-ნუკლეოფილური მონომერები - ბის-(ფენილალანინ)-1,4-ბუტილენდიესტერის დი- β -ტოლუოლსულფონატი (F4) და ბის-(ლეიცინ)-1,4-ბუტილენდიესტერის დი- β -ტოლუოლსულფონატი (L6) დავასინთეზეთ ამინომჟავების (2 მოლი) პირდაპირი კონდენსაციით შესაბამის დიოლებთან (1 მოლი) მდულარე ბენზოლის არეში β -ტოლუოლსულფომჟავას (2 მოლი) თანაობისას, ადრე აღწერილი მეთოდიკის შესაბამისად [25] და გავასუფთავეთ გადაკრისტალებით წყლიდან. ბის-ელექტროფილური მონომერები - დი- β -ნიტროფენილადიპინატი (NP-4) და დი- β -ნიტროფენილსეზაგინატი (NP-8) მივიღეთ β -ნიტროფენოლის (2 მოლი) ურთიერთქმედებით შესაბამის დიაცილდიქლორიდთან (1 მოლი) აცეტონის არეში პირიდინის (2 მოლი) თანაობისას, როგორც აღწერილია [25]-ში. NP-4 და NP-8 მონომერები გავასუფთავეთ გადაკრისტალებით ეთილაცეტატიდან.

ფსევდოპროტეინების სინთეზი და დახასიათება. ნანოკომპოზიტების მიღების მიზნით მატრიქსებად გამოვიყენეთ პოლიესტერამიდის კლასის ორი ფსევდოპროტეინი - 4F4 ადიპინის მჟავას, L-ფენილალანინის და ბუტანდიოლის საფუძველზე და 8L6 სეზაგინის მჟავას, L-ლეიცინის და ჰექსანდიოლის საფუძველზე. მათი სინთეზი განვახორციელეთ ზემოთ აღწერილი ბიფუნქციური მონომერების პოლიკონდენსაციით N,N-დიმეთილაცეტამიდის ხსნარში ტრიეთილამინის როგორც β -ტოლუოლსულფომჟავას აქცეპტორის თანაობისას [25] - მოყვანილი მეთოდიკების შესაბამისად მივიღეთ - 4F4: F4-ის ურთიერთქმედებით NP-4-თან, 8L6: L6-ის ურთიერთქმედებით NP-8-თან.

ფსევდოპროტეინების სტრუქტურა რიგი ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდების (იწ და ზმრ სპექტროსკოპია, დიფერენციალური მასკანირებელი კალორიმეტრია). გამოყენებით შესწავლილია ჩვენს ადრეულ კვლევაში [25]. დადგენილია, რომ 4F4 სემიკრისტალური პოლიმერია გამინების ტემპერატურით 59°C და ლლობის ტემპერატურით 104°C, ხოლო 8L6 ამორფული პოლიმერია გამინების ტემპერატურით 37°C. ახლადსინთეზირებული პოლიმერებისთვის მნიშვნელოვანია განისაზღვროს მოლეკულურ-მასური მახასიათებლები - საშუალო წონითი (M_w) მოლეკულური მასები და დისპერსიულობა (D). გაზომვები ჩავატარეთ ადრე აღწერილი გელ-შედწევადი ქრომატოგრაფიის მეთოდით (ქრომატოგრაფი Waters Associates, Inc. Milford, United States). მივიღეთ შემდეგი მახასიათებლები - 4F4: M_w 32,600 და $D=1.56$, 8L6 - M_w 62,400 და $D=1.74$ რაც ოპტიმალურია კვლევაში დასახული ნანოკომპოზიტების მისაღებად.

4F4 და **8L6** ფსევდოპროტეინების ბიოდეგრადაცია შესწავლილი იყო ორი მეთოდით - პოტენციომეტრული ტიტრაციით [26] და ნიმუშების წონის კლებით [27]. მათი ბიოდეგრადაციის სიჩქარე იმ ზღვრებშია, რომლებიც ოპტიმალურია ჩვენს მიერ დაგეგმილი კონტროლირებადი გამოყოფის ნანოკომპოზიტების შესაქმნელად.

ნანოკომპოზიტების მიღება (ზოგადი პროცედურა). ბენზოილის ზეჟანგის (**ბზ**) ინკაფსულირება ფსევდოპროტეინულ ნანონაწილაკში ჩავატარეთ ერთ პროცედურად: ნანოკომპოზიტები (**ნკ**) მივიღეთ ე.წ. პოლიმერის გამოლექვის/გამხსნელის ჩანაცვლების ანუ ნანოპრეციპიტაციის მეთოდით [28]. ტიპურ ექსპერიმენტში წინასწარ განსაზღვრული რაოდენობის ფსევდოპროტეინს ვხსნიდით წყალთან შერევად ორგანულ გამხსნელში (**დმფ ან დმსო**, **8L6**-ის შემთხვევაში ასევე აცეტონი) და ვამატებდით სხვადასხვა რაოდენობის **ბზ**-ს (ფსევდოპროტეინის მასის 10, 20 და 30 %-ს). მიღებულ ხსნარს (ე.წ. ორგანული ფაზა) ვარირებადი მორევის სიჩქარის პირობებში ვაწვეთებდით **ზან**-ის შემცველ წყალში, სადაც ხდებოდა ნანონაწილაკების გამოილექვა. ჩაწვეთების სიჩქარე ყველა ექსპერიმენტში იყო 12 წვეთი/წთ - ოპტიმალური ადრე ჩატარებული კვლევის შესაბამისად [28]. **ზან**-ბად გამოვიყენეთ **Tween-20** და **Tween-40**. ორგანული და წყლის ფაზების თანაფარდობა ყველა ექსპერიმენტში იყო 1:10, ასევე ადრეული კვლევის შესაბამისად [28]. მიღებულ ნანოსუსპენზიას ვასუფთავებდით ორგანული გამხსნელისა და ჭარბი **ზან**-ისგან დიალიზით გამოხდილი წყლის მიმართ 48 სთ-ის განმავლობაში. წყალს ვცვლიდით ყოველი 8 სთ-ის განმავლობაში. სადიალიზე პარკი: Dialysis membrane (MWCO 25 kDa), Nominal Flat Width: 34 mm, Diameter: 22 mm, Vol/Length: 3.7 mL/cm, Length: 10 m/ 33 ft;

მიღებული ნანონაწილაკების ზომებს (MPD), დისპერსიულობას (PDI) და ზედაპირულ მუხტს (Z-პოტენციალს) ვაფასებდით დინამიკური ლაზერული შუქგაბნევის (DLS) მეთოდით (Laser Nanozetasizer Nano ZS ZEN 3600, Malvern Instruments, UK).

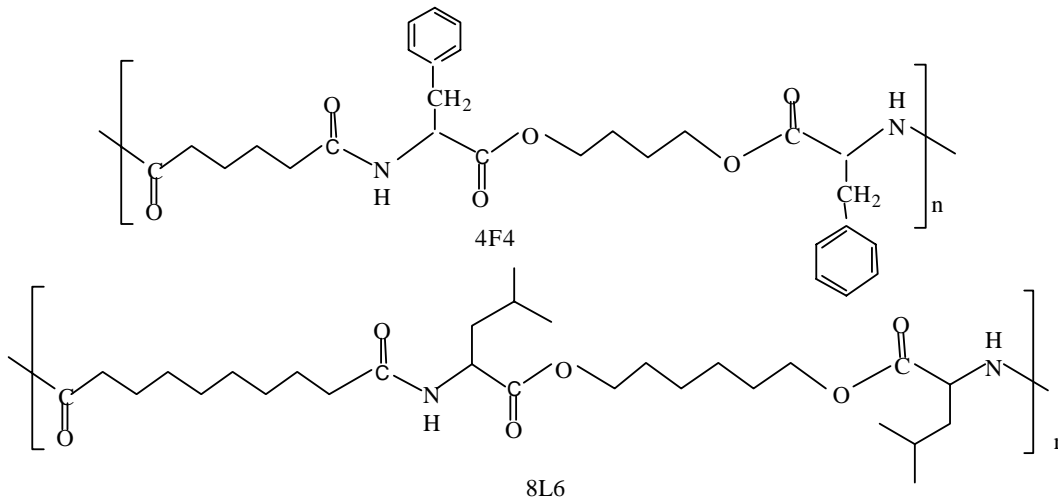
შედეგები და მათი განსჯა

ფსევდოპროტეინული მატრიქსების სინთეზი

ნანოკომპოზიტებისათვის მისაღები მატრიქსების შერჩევა განვახორციელეთ ლიტერატურული მასალის ანალიზის საფუძველზე: დასახული მიზნის მისაღწევად პოლიმერულ მატრიქსებს უნდა ახასიათებდეს ჰიდროფობურობა (რათა გამოირიცხოს პრეპარატის დიფუზიური გამორეცხვა წყლით), კარგი ხსნადობა ორგანულ გამხსნელებში, რათა ადვილად ჩამოყალიბდეს ნაწილაკები ნანოპრეციპიტაციის მეთოდით. უმნიშვნელოვანესია ასევე მატრიქსების ბიოდეგრადაციის სიჩქარე, რათა მიღწეულ იქნეს პრეპარატის გამოყოფის საჭირო პროფილი. ზეჟანგების კაფსულირებისათვის ყველაზე ფართოდ გამოყენებული მატრიქსების უმეტესობა (მაგ., PLGA) ვერ უზრუნველყოფს ზეჟანგების კონტროლირებადი, დაბალი სიჩქარით გამოყოფის სასურველ პროფილს.

ნანოკომპოზიტების მისაღებ პერსპექტიულ მატრიქსებად მივიჩნიეთ ჩვენს მიერ ადრე მიღებული AABB-ტიპის, პოლიკონდენსაციური პოლიმერები ბუნებრივი α -

ამინომჟავების საფუძველზე ე.წ. ფსევდოპროტეინები, რომელთაც დღეისათვის მიღებულ სხვადასხვა კლასის ბიოდეგრადირებად პოლიმერებს შორის თავისი მახასიათებლებით უდავოდ ერთ-ერთი მოწინავე პოზიცია უკავიათ [24,29]. ფსევდოპროტეინების მრავალფეროვან წარმომადგენლებს შორის შევარჩიეთ ორი პოლიესტერამიდური კლასის წარმომადგენელი - მაღალჰიდროფობური და სემიკრისტალური **4F4** ადიპინის მჟავას, L-ფენილალანინის და ბუტანდიოლის საფუძველზე და ნაკლებად ჰიდროფობური და ამორფული **8L6** სებაცინის მჟავას, L-ლეიცინის და ჰექსანდიოლის საფუძველზე. კვლევისთვის შერჩეული ფსევდოპროტეინების სტრუქტურა მოყვანილია სქემა 1-ზე.



სქემა 1. ფსევდოპროტეინების **4F4** და **8L6** სტრუქტურები

განმარტების თანახმად, ფსევდოპროტეინებს ვუწოდებთ ჰეტეროჯაჭვურ პოლიმერებს დიამინო-დიესტერების საფუძველზე [29]. მათ სტრუქტურაში თავიდან (მონომერების სინთეზის ეტაპზე) ჩადებულია ორი, შედარებით ადვილჰიდროლიზებადი ესტერული ბმა, რომლებიც უზრუნველყოფენ ფსევდოპროტეინების ჰიდროლიზურ დეგრადაციას [26,27,30].

მიზნობრივი **4F4** და **8L6** დავასინთეზეთ ადრე შემუშავებული ე.წ. აქტივირებული პოლიკონდენსაციის მეთოდით [25], რომლის შესაბამისადაც პოლიკონდენსაციის რეაქცია ხორციელდება რბილ პირობებში. ეს პროცესი უზრუნველყოფს თანამდერეაქციების მაქსიმალურ დათრგუნვას და სტრუქტურულად ერთგვაროვანი აღნაგობის პოლიმერების სინთეზს, რაც მნიშვნელოვანია მათი გამოყენებისათვის ბიოსამედიცინო დანიშნულების მასალებად. ამ მოსაზრებითაა გამოწვეული ის ფაქტი, რომ ჰოლანდიური კომპანია Royal DSM სამედიცინო დანიშნულების ფსევდოპროტეინის მისაღებად (რომელიც უკვე დანერგულია პრაქტიკაში) დღემდე იყენებს ჩვენს მიერ შემუშავებულ აქტივირებული პოლიკონდენსაციის მეთოდს [30,31].

ფსევდოპროტეინები **4F4** და **8L6** დახასიათებული იყო რიგი ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდებით (იწ და ზმრ სპექტროსკოპია, დიფერენციალური მასკანირებელი კალორიმეტრია) ჩვენს ადრეულ კვლევაში [25]. დავადგინეთ, რომ **4F4** სემიკრისტალური პოლიმერია გამინების ტემპერატურით 59°C და ლღობის ტემპერატურით 104°C, ხოლო **8L6** - ამორფული პოლიმერი გამინების ტემპერატურით 37°C. ახლადსინთეზირებული პოლიმერებისთვის შევისწავლეთ მოლეკულურ-მასური მახასიათებლები - საშუალო წონითი (M_w) მოლეკულური მასები და დისპერსიულობა (D). გაზომვები ჩავატარეთ ადრე აღწერილი [25] გელ-შელწევადი ქრომატოგრაფიის მეთოდით. მივიღეთ შემდეგი მახასიათებლები - **4F4**: M_w 32,600 და $D=1.56$, **8L6** - M_w 62,400 და $D=1.74$. რაც შეეხება ბიოდეგრადაციას ცდებში in vitro, პოლიესტერამიდური კლასის ფსევდოპროტეინების ბიოდეგრადაცია ადრე შესწავლილი იყო სხვადასხვა მეთოდებით [26,27,30]. მნიშვნელოვანია, რომ ამ კლასის ბიოდეგრადირებადი პოლიმერების ბიოდეგრადაციის სიჩქარე იმ ზღვრებშია, რომლებიც ოპტიმალურია ჩვენს მიერ დაგეგმილი კონტროლირებადი გამოყოფის ნანოკომპოზიტების შესაქმნელად.

კვლევაში გამოყენებულ ფსევდოპროტეინებს ახასიათებს კარგი ხსნადობა ორგანულ გამხსნელებში, რაც მნიშვნელოვანია მათი გადამუშავებისათვის: **4F4** იხსნება დმფ-ში, დმა-ში, დმსო-ში, ქლოროფორმში, დიქლორმეთანში; გაცილებით მაღალი ხსნადობით გამოირჩევა ლეიცილის საფუძველზე მიღებული **8L6**, რომელიც ჩამოთვლილი გამხსნელების გარდა იხსნება ასევე მეთანოლში, ეთანოლში, აცეტონში და ტეტრაჰიდროფურანში. ორივე პოლიმერი უხსნადია დიეთილეთერში და ეთილაცეტატში. ბიოდეგრადაციისას პოლიესტერული კლასის ფსევდოპროტეინები გამოყოფენ ნეიტრალურ და ორგანიზმისთვის უვნებელ პროდუქტებს, როგორებიცაა ამინომჟავები, არატოქსიკური ალიფატური დიოლები და სუსტი დიკარბომჟავები, რაც კრიტიკული მნიშვნელობისაა მათი გამოყენებისათვის ბიომედიცინაში, განსაკუთრებით ისეთი ქსოვილებისთვის, რომლებიც მგრძნობიარეა ბიოდეგრადაციის ძლიერმჟავა პროდუქტების მიმართ (რომლებსაც გამოყოფენ ბიოკომპოზიტებში მატრიქსების სახით ხშირად გამოყენებული პოლიგლიკოლის და პოლირიძის მჟავები). დასასრულს შევნიშნავთ, რომ დასახული ამოცანების რეალიზაციისთვის უმნიშვნელოვანესია ის გარემოება, რომ შერჩეულ ფსევდოპროტეინებს გააჩნიათ სტაბილური ნანონაწილაკების წარმოქმნის უნარი [28].

ნანოკომპოზიტების მიღება

ჩვენს მიერ დასახული ამოცანების მისაღწევად, შევიმუშავეთ ბენზოილის ზეჟანგის (**ბზ**-ის) ნანოკაფსულირების მეთოდი, რომელიც მნიშვნელოვანწილად ეფუძნება ფსევდოპროტეინული ნანონაწილაკების ფორმირების ჩვენს ადრეულ კვლევებს [28]. **ბზ** მყარი ნივთიერებაა, სტაბილური ოთახის ტემპერატურაზე. იგი ძლიერი, არატოქსიკური დამჟანგველია [32], რომელიც გამოსადეგია ეფექტურ ანტიბაქტერიულ და კერატოლიტურ საშუალებად აკნეს, დამწვრობების, ვარიკოზის მკურნალობისათვის. **ბზ** ოფიციალურად დამტკიცდა აშშ-ში აკნეს სამკურნალო საშუალებად 1960 წელს [33].

თუმცა უნდა აღვნიშნოთ, რომ **ბზ** იწვევს კანის სიმშრალეს და გაღიზიანებას, ცუდად იხსნება წყალში და ქიმიურად არამდგრადია, რაც გარკვეულად ზრუდავს მის გამოყენებას. გაცილებით პერსპექტიულია სამკურნალო საშუალებად **ბზ**-ის შემცველი პოლიმერული კომპოზიტების გამოყენება.

კვლევის ობიექტად შერჩეული, **ბზ**-ის შემცველი, პოლიმერული ნანოკომპოზიტები მივიღეთ ზემოაღნიშნული ფსევდოპროტეინების საფუძველზე. გამოვიყენეთ ე.წ. ნანოპრეციპიტაციის (გამოლექვის) მეთოდი [28], **ზან**-ის, როგორც ნანონაწილაკების სტაბილიზატორების, თანაობისას. **ზან**-ებად შევარჩიეთ არაიონური **Tween-20** და **Tween-40**. **ზან**-ის შერჩევას გადამწყვეტი მნიშვნელობა აქვს ფორმირებადი ნანონაწილაკების ზომების თვალსაზრისით - სასურველია, სამედიცინი დანიშნულების ბიოკომპოზიტური ნანონაწილაკების ზომები იყოს ≤ 100 ნმ; კვლევაში გამოყენებული ორივე **ზან**-ი აკმაყოფილებს ამ პირობას.

ნანოკომპოზიტების მიღების ყველა ექსპერიმენტი ჩავატარეთ ოთახის ტემპერატურაზე. ბიოკომპოზიტური ნარევის მოსამზადებლად წინასწარ განსაზღვრული რაოდენობის ფსევდოპროტეინს ვხსნიდით 2 მლ წყალთან შერევად ორგანულ გამხსნელში, რომელშიც იხსნება ასევე **ბზ**, ვამატებდით ამ უკანასკნელს ფსევდოპროტეინული მატრიქსის მასის 10, 20 ან 30 %-ის ოდენობით და ვურევდით ნარევის სრულ ჰომოგენიზაციამდე. პარალელურად **ზან**-ს (**Tween-20** ან **Tween-40**) ვხსნიდით გამოხდილ წყალში და მიღებული ხსნარის 10 მლ-ს წვეთობით ვამატებდით 1 მლ ბიოკომპოზიტური ნარევის ხსნარს. მიღებულ ნანოსუსპენზიას ვათავსებდით სადიალიზე პარკში და ვატარებდით დიალიზს გამოხდილი წყლის მიმართ.

მიღებული ნანოსუსპენზიას ვსწავლობდით დინამიკური ლაზერული შუქგაბნევის მეთოდით და ვახასიათებდით შემდეგი პარამეტრებით: ნაწილაკების საშუალო დიამეტრით (MPD), პოლიდისპერსიულობის ინდექსით (PDI) და Z-პოტენციალით.

შევისწავლეთ აღნიშნულ პარამეტრებზე ისეთი ფაქტორების გავლენა, როგორებიცაა მატრიქსის სტრუქტურა და ორგანული ფაზის (გამხსნელის) ბუნება, **ზან**-ის ბუნება, ორგანული ფაზის კონცენტრაცია და არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარე.

გამოვიყენეთ ორი პოლარული, წყალთან შერევადი გამხსნელი - **დმფ** და **დმსო**, რომელშიც იხსნება ორივე ფსევდოპროტეინი **4F4** და **8L6**, ასევე აცეტონი, რომელშიც დამატებით იხსნება **8L6**. ორგანული ფაზის კონცენტრაცია ყველა შემთხვევაში იყო 3 მგ/მლ (ბიოკომპოზიტური ნარევის მიხედვით), რაც დადგინდა, რომ არის ოპტიმალური (იხ. ქვემოთ). ექსპერიმენტები ჩავატარეთ ბიოკომპოზიტში **ბზ**-ის შუალედური შემცველობისას (20%) გამოვიყენეთ რა **ზან**-ად **Tween-20**. არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარე იყო 500 ბრუნნი/წთ (რომელიც მისაღებია 100 ნმ-ზე გაცილებით მცირე ნანონაწილაკების ფორმირებისათვის, იხ. ქვემოთ). შევნიშნავთ, რომ თუ ნანოპრეციპიტაციას ვახდენდით სუფთა წყალში (**ზან**-ის გარეშე), ყველა შემთხვევაში ადგილი ჰქონდა ნაწილაკების აგრეგაციას და პოლიმერის გამოლექვას.

შედეგები, მიღებული ორივე ფსევდოპროტეინისათვის (ცხრ.1), გვიჩვენებს, რომ ნანონაწილაკების ზომების გათვალისწინებით (MPD \ll 100 ნმ) საუკეთესოა **დმსო**, თუმცა

ნაწილაკების დისპერსიულობის (PDI) თვალსაზრისით ჩამორჩება სხვა გამოყენებულ გამხსნელებს. მივანიჭეთ რა პრიორიტეტი ნაწილაკების ზომებს, შემდგომი ექსპერიმენტები ჩავატარეთ დმსო-ში.

შევისწავლეთ ნანონაწილაკების ფორმირების პროცესი ბზ-ის სხვადასხვა კონცენტრაციისას (ფსევდოპროტეინის მატრიქსის 10, 20, 30%). მიღებული ნანოკომპოზიტების მახასიათებლები. მოყვანილია ცხრ. 2-ში. შედეგებიდან ჩანს, რომ ორივე ფსევდოპროტეინის შემთხვევაში ნანონაწილაკების საშუალო დიამეტრი (MPD) და პოლიდისპერსიულობის ინდექსი (PDI) მნიშვნელოვნად არ არის დამოკიდებული ბიოკომპოზიტურ ნარევეში ბზ-ის შემცველობაზე. შევნიშნავთ, რომ ბზ-ის კონცენტრაციის მატება იწვევს ნანონაწილაკების Z-პოტენციალის გაზრდას,

ცხრილი 1. ორგანული ფაზის (გამხსნელი+ფსევდოპროტეინი) ბუნების გავლენა ნანონაწილაკების ზომებზე *

გამხსნელი	MPD (nm) ±SD	PDI±SD	MPD (nm) ±SD	PDI±SD
	ფსევდოპროტეინი 4F4		ფსევდოპროტეინი 8L6	
დმფ	138.00 ± 0.31	0.116 ±0.011	117.00±0.4	0.180 ±0.006
დმსო	50.29 ± 0.40	0.480 ±0.012	39.55±0.20	0.309 ±0.010
აცეტონი	-	-	192.00±0.50	0.105±0.003

* ორგანული ფაზის კონცენტრაცია 3.0 მგ/მლ, ბზ-ის შემცველობა 20%; არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარე 500 ბრუნი/წთ, ზან-ი Tween-20;

MPD - ნაწილაკის საშუალო დიამეტრი, PDI - პოლიდისპერსიულობის ინდექსი, SD - სტანდარტული გადახრა. სამი გაზომვის საშუალო.

ცხრილი 2. ფსევდოპროტეინების ბაზაზე მიღებული ნანონაწილაკების მახასიათებლები ბიოკომპოზიტში ბზ-ის სხვადასხვა % კონცენტრაციისას *

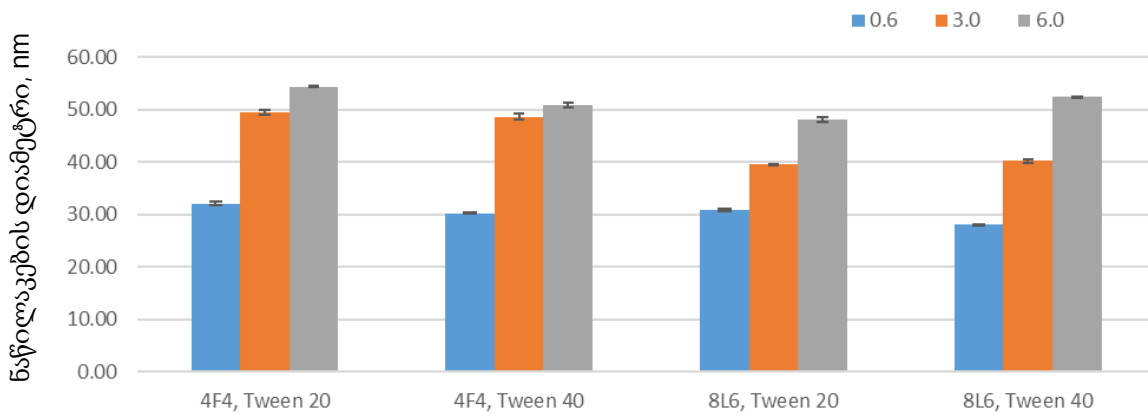
ბზ-ის % შემცველობა ბიოკომპო- ზიტში	MPD (nm) ±SD	PDI ±SD	Z-პოტენცი- ალი, mV	MPD (nm) ±SD	PDI ±SD	Z- პოტენცი ალი, mV
	ფსევდოპროტეინი 4F4			ფსევდოპროტეინი 8L6		
10	49.51±0,2	0.404±0,010	-17.9±0,4	45.90±0,4	0.476±0.010	14.93±0.2
20	49.54±0,4	0.470 ±0,012	-18.7±0,6	39.50±0,1	0.316±0,008	17.90±0,2
30	53.05±0,4	0.490±0,010	-21.2±0,3	42.52±0,2	0.505±0,014	20.46±0,4

* ორგანული ფაზის კონცენტრაცია 3.0 მგ/მლ დმსო. არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარე 500 ბრუნი/წთ, ზან-ი Tween-20; MPD - ნაწილაკის საშუალო დიამეტრი, PDI - პოლიდისპერსიულობის ინდექსი, SD- სტანდარტული გადახრა. სამი გაზომვის საშუალო .

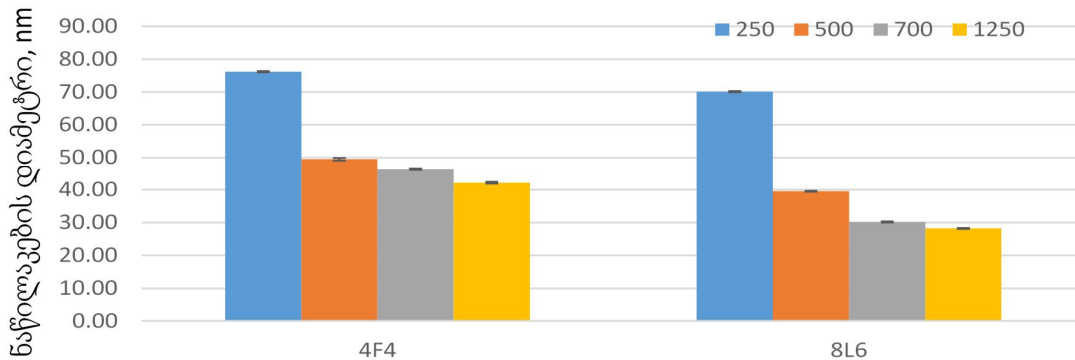
რაც დადებითი ფაქტორია ნანოსუსპენზიების მდგრადობის თვალსაზრისით. შემდეგომ ექსპერიმენტებში, ნანონაწილაკების ყველა მახასიათებლის გათვალისწინებით, სამუშაო კონცენტრაციად ავირჩიეთ 20% ზზ.

შევისწავლეთ ორგანულ ფაზაში ბიოკომპოზიტის კონცენტრაციის გავლენა ფორმირებადი ნანონაწილაკების ზომებზე. ნახ. 1-ზე მოყვანილია მიღებული შედეგები ორივე მარტიქსისათვის (4F4 და 8L6) და ორივე ზან-ის (Tween-20 და Tween-40) გამოყენებით. ფსევდოპროტეინული მატრიქსებიდან უფრო მცირე ზომის ნანონაწილაკებს იძლევა 8L6. ორგანულ ფაზაში ბიოკომპოზიტის ყველა კონცენტრაციისას მიღებული ნანონაწილაკების ზომები სასურველ ფარგლებშია (< 100 ნმ), თუმცა ოპტიმალურად მივიჩნიეთ 3.0 მგ/მლ, რამეთუ 0.6 მგ/მლ კონცენტრაციისას აქტიური პროდუქტის შემცველობა ნანოსუსპენზიაში ძალიან დაბალია, ხოლო 6.0 მგ/მლ შემთხვევაში მოსალოდნელია ნანონაწილაკების კოაგულაცია. რაც შეეხება ზან-ებს, ორივე შემთხვევაში მიღებული შედეგები პრაქტიკულად იდენტურია. უპირატესობა მივანიჭეთ Tween-20-ს, როგორც უფრო ჰიდროფილურ ზან-ს - Tween-40-ის ჰიდროფილურ-ლიპოფილური ბალანსი (HLB) უდრის 15.6, ხოლო Tween-20-ის ≈ 16.7; ჩავთვალეთ, რომ ამ უკანასკნელის მოცილება ნარევიდან დიალიზით წყლის მიმართ, უფრო სრულყოფილი იქნებოდა

დავადგინეთ ასევე, რომ, ორგანული ფაზის დამატებისას, ბიოკომპოზიტური ნანონაწილაკების ზომებზე გავლენას ახდენს არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარე (ნახ. 2). ამ მონაცემების თანახმად, არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარისას 500-1250 ბრ/წთ ნაწილაკების ზომები სასურველ ფარგლებშია (50 ნმ და ქვემოთ).



ნახ. 1. ორგანული ფაზის კონცენტრაციის (მგ/მლ) გავლენა ნანოკომპოზიტების ზომებზე Tween-20 და Tween-40 -ის თანაობისას. კონცენტრაციები: 0.6, 3, 6.0 მგ/მლ დმსო-ში; არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარე 500 ბრ/წთ; ზზ-ის შემცველობა ბიოკომპოზიტში 20%.



ნახ.2. წყლის ფაზის მორევის სიჩქარის გავლენა ნაწილაკების ზომებზე Tween-20-ის თანაობისას. მორევის სიჩქარე: 250, 500, 700 და 1250 ბრ/წთ. ორგანული ფაზის კონცენტრაცია 3.0 მგ/მლ დმსო-ში; ზზ-ის შემცველობა ბიოკომპოზიტში 20%;

ნანოკომპოზიტების მდგრადობა.

ნანოპრეპარატების პერსპექტული გამოყენების თვალსაზრისით მზიშვებლოვანია ნანოსუსპენზიების მდგრადობა, მათი შენახვის პირობების დადგენა. შევისწავლეთ ნანოსუსპენზიების მდგრადობა ოთახის ტემპერატურაზე და მაცივარში. სტაბილურობას ვაფასებდით ნანანაწილაკების ზომების (MPD) ცვლილებით დროში. მიღებული შედეგები მოყვანილი ცხრ. 3-ში გვიჩვენებს, რომ უფრო მაღალი მდგრადობით გამოირჩევა ფსევდოპროტეინ 8L6-ის საფუძველზე მიღებული ნანოსუსპენზიები, რომელთა ნაწილაკების ზომები არ იცვლება 3 თვის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე კი, მაშინ როდესაც 4F4-ის საფუძველზე მიღებული ნანოსუსპენზიები, 3 თვის განმავლობაში განიცდიან სრულ აგრეგაციას და ამ პერიოდის განმავლობაში მდგრადობას ინარჩუნებენ მხოლოდ მაცივარში შენახვისას..

ცხრილი 3. ფსევდოპროტეინების საფუძველზე მიღებული ნანოკომპოზიტების სტაბილურობა შენახვისას.

დრო	ოთახის ტემპ.	მაცივარი	ოთახის ტემპ.	მაცივარში
	4F4 , MPD (nm) ±SD *		8L6, MPD (nm) ±SD *	
ახლად-მიღებული	49.54±0,4	49.54±0,4	39.50±0,1	39.50±0,1
ერთი კვირა	51.20±0.3	49.70±0,4	39.59 ± 0.2	40.25±0.3
ერთი თვე	55.24±0.4	52.15±0.3	42.24 ± 0.4	40.90 ± 0.2
სამი თვე	სრული აგრეგაცია	54.64 ± 0.4	45.14± 0.5	42.50 ±0.3

* მიღებულია Tween 20-ის თანაობისას.

დასკვნა

განხორციელებული კვლევის საფუძველზე მიღებულია **ბზ**-ის შემცველი ნანოკომპოზიტები. მატრიქსებად გამოყენებულია ამინომჟავური ბიოდეგრადირებადი პოლიმერები ე.წ. ფსევდოპროტეინები. შესწავლილია როგორც ნანოკომპოზიტების ფორმირების პირობები, ასევე მათი მდგრადობა შენახვისას.

ჩატარებული კვლევების საფუძველზე **ბზ**-ის შემცველი ბიოკომპოზიტური ნანოპრეპარატის მისაღებად საუკეთესოდ მივიჩნიეთ:

- მატრიქსად ფსევდოპროტეინი - **8L6**;
- გამხსნელად (ორგანულ ფაზად) - **დმსო**;
- ორგანული ფაზის კონცენტრაციად - 3.0 მგ/მლ;
- ბენზოილის ზეჟანგის შემცველობად ორგანულ ფაზაში - 20%;
- ზედაპირულად აქტიური ნაერთად - **Tween-20**.
- არაორგანული ფაზის მორევის სიჩქარედ - 500 - 1250 ბრუნი/წთ.

ვვარაუდობთ, რომ მიღებული ნანოკომპოზიტები პერსპექტიულია სამკურნალო პრეპარატებად ჰიპოქსიით მიმდინარე სხვადასხვა დაავადებათა (იშემიის, ტრამვების და სხვ.), ასევე სიმსივნეების და ინფექციური დაავადებების სამკურნალოდ [33,34], რის მისაღწევადაც საჭიროა ხანგრძლივი, კომპლექსური *in vitro* და *in vivo* კვლევები. კვლევის შემდეგ ეტაპად დაგეგმილი გვაქვს ნანოკომპოზიტებიდან ჰიდროლაზებით კატალიზებული **ბზ**-ის ელუცია ცდებში *in vitro*.

ლიტერატურა

1. Cavalli, R., Akhter, A.K., Bisazza, A., Giustetto, P., Trotta, F., Vavia, P. 2010. Nanosponge formulations as oxygen delivery systems. *Int. J Pharm*, 402 (1-2), 254–257.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.025>.
2. Northup, A., Cassidy, D. 2008. Calcium peroxide (CaO₂) for use in modified Fenton chemistry. *J Hazard Mater*, 152, 1164–1170. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.096>
3. Dluzneski, P.R., Salvador, T., Kozel, T.H. 2017. Encapsulation of peroxides for skin applications. Patent # CA3016436A (Canada).
4. Jelvehgari, M., Siahi-Shadbad, M.R., Azarmi, S., Martin, G.P., Nokhodchi, A. 2006. The micro sponge delivery system of benzoyl peroxide: Preparation, characterization and release studies. *Intern. J. of Pharmac.*, 308(1–2), 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.001>.
5. Ingebrigtsen, S.G., Škalko-Basnet, N., Cavalcanti Jacobsen, C., Holsæter, A.M. 2017. Successful co-encapsulation of benzoyl peroxide and chloramphenicol in liposomes by a novel manufacturing method - dual asymmetric centrifugation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 97, 192-199.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.017>.

6. Ward, K., Huvard, G., Carpenter, E., Sandhu, G., Barbee, R., Spiess, B. 2007. Methods and Compositions for Controlled and Sustained Production and Delivery of Peroxides and/or Oxygen for Biological and Industrial Applications. United States Patent # 20090169630A1.

7. Chin, K., Khattak, S.F., Bhatia, S.R., Roberts, S.C. 2008. Hydrogel-perfluorocarbon composite scaffold promotes oxygen transport to immobilized cells. *Biotechnol. Prog.*, 24, 358–366. <https://doi.org/10.1021/bp070160f>.

8. Goh, F., Gross, J.D., Simpson, N.E., Sambanis, A. 2010. Limited beneficial effects of perfluorocarbon emulsions on encapsulated cells in culture: Experimental and modeling studies. *J. Biotechnol.* 150, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.013>.

9. Ward, C.L., Corona, B.T., Yoo, J.J., Harrison, B.S., Christ, G.J. 2013. Oxygen generating biomaterials preserve skeletal muscle homeostasis under hypoxic and ischemic conditions. *PLOS One*, 8(8), e72485.

10. Lee, H.Y., Kim, H.W., Lee, J.H., Oh, S.H. 2015. Controlling oxygen release from hollow microparticles for prolonged cell survival under hypoxic environment. *Biomaterials*, 53, 583-591. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.117>.

11. Harrison, B.S., Eberli, D., Lee, S. J., Atala, A., Yoo, J. J. 2007. Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. *Biomaterials*, 28 (31), 4628-4634. <https://doi.org/10.1016/bsj.biomaterials.2007.07.003>.

12. Oh, S.H., Ward, C.L, Atala A., Yoo J.J., Harrison B.S. 2009. Oxygen generating scaffolds for enhancing engineered tissue survival. *Biomaterials*, 30, 757–762. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.065>.

13. Steg, H., Buizer, A.T. , Woudstra, W., Veldhuizen, A.G., Bulstra, S.K., Grijpma, D.W., Kuijjer, R. 2015. Control of oxygen release from peroxides using polymers. *J. Mat. Sci., Materials in Medicine*, 26, 207. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5542-z>

14. Dehghani, F., Annabi, N. 2011. Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Curr. Opin. Biotechnol*, 22(5), 661-666. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.005>.

15. Li, Z. , Guo, X., Guan, J. 2012. An oxygen release system to augment cardiac progenitor cell survival and differentiation under hypoxic condition. *Biomaterials*, 33(25), 5914-5923. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.012>

16. Seyyed, Nasrollah, S.A., Karimi-Soflou, R., Karkhaneh, A. 2023. Photo-click crosslinked hydrogel containing MgO₂-loaded PLGA microsphere with concurrent magnesium and oxygen release for bone tissue engineering. *Materialstoday Chemistry*, 28, 101389.

<https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2023.101389>

17. Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S. 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46, 1733–1742. <https://doi: 10.2337/diab.46.11.1733>
18. Gao, C., Huang, Y., Zhang, L., Wei, P., Jing, W., Wang, H., Yuan, Z., Zhang, D., Yu, Y., Yang, X., Cai, Q. 2022. Self-reinforcement hydrogel with sustainable oxygen-supply for enhanced cell ingrowth and potential tissue regeneration. *Biomater. Advan.*, 141, 213105. <https://doi: 10.1016/j.bioadv.2022.213105>.
19. Gibbins, B.L. Hopman, L. D. 2007. Matrices/dressing for oxygen delivery to tissues – are useful only for localized delivery of oxygen directly to tissues. US Patent #7,160,553.
20. Pedraza, E., Coronel, M.M., Fraker, C.A., Ricordi, C., Stabler, C.L. 2012. Preventing hypoxia-induced cell death in betacells and islets via hydrolytically activated, oxygen-generating biomaterials. *PNAS*, 109 (11), 4245–4250. <https://doi: 10.1073/pnas.1113560109>.
21. Mallepally, R.R., Parrish, Ch.C., Hugh, M.M.Mc., Ward, K.R. 2014. Hydrogen peroxide filled poly(methyl methacrylate) microcapsules: Potential oxygen delivery materials. *Int. J. Pharm.*, 475 (1–2), 130-137.
22. Keller, D.C., Buechel, M. 2017. Periodontal Treatment with Direct Medication Delivery of Hydrogen Peroxide and Oxygen. *Oral health case Rep.*, 3,133. <https://doi: 10.4172/ 2471-8726.1000133>
23. Waite, A.J., Bonner, J.S. 1999. Autenrieth R. Kinetics and stoichiometry of oxygen release from solid peroxides. *Environ Eng Sci.*, 6, 187–199. <https://doi:10.1089/ees.1999.16.187>
24. Yousefzade, O., Katsarava, R., Puiggalí, J. 2020. Biomimetic Hybrid Systems for Tissue Engineering. *Biomimetics*, 5, 49; doi:10.3390/biomimetics5040049.
25. Katsarava, R., Beridze, V., Arabuli, N., Kharadze, D., Chu, C.C., Won, C.Y. 1999. Amino acid-based Bioanalogous polymers. Synthesis, and study of regular poly(ester amide)s based on bis(α -amino acid)- ω -alkylene diesters, and aliphatic dicarboxylic acids. *J. Polymer Sci., pol.chem.*, 37, 391-407.
26. Tsitlanadze, G., Kviria, T., Chu, C.C., Katsarava, R. 2004. Biodegradation of amino acid based poly(ester amide)s: in vitro study using potentiometric titration. *J Mater Sci.: Mater in Medicine* 15, 185-190.
27. Tsitlanadze, G., Machaidze, M., Kviria, T., Djavakhishvili, N., Chu, C.C., Katsarava, R. 2004. Biodegradation of amino acid based poly(ester amide)s: in vitro weight loss and preliminary in vivo studies. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 15 (4), 1-24.
28. Kantaria, T., Kantaria, T., Kobauri, S., Ksovreli, M., Kachlishvili, T., Kulikova, N., Tugushi, D., Katsarava, R. 2016. Biodegradable Nanoparticles Made of Amino-Acid-Based Ester Polymers:

Preparation, Characterization, and in Vitro Biocompatibility Study. *Appl. Sci.*, 6, 444; <https://doi.org/10.3390/app6120444>

29. Katsarava, R., Kantaria, Ten., Kobauri, S. 2021. Pseudo-proteins and related synthetic amino acid based polymers (Review). *J. Mater. Educ.*, 43 (1-2), 33-80.

30. Ghaffar, A., Draaisma, G.J.J., Mihov, G., Dias, A.A., Schoenmakers, P.J., van der Wal, S.J. 2011. Monitoring the in Vitro Enzyme-Mediated Degradation of Degradable Poly(ester amide) for Controlled Drug Delivery by LC-ToF-MS. *Biomacromolecules*, 12, 3243–3251.

31. Sun, H., Meng, F., Dias, A.A., Hendriks, M., Feijen, J., Zhong, Z. 2011. α -Amino Acid Containing Degradable Polymers as Functional Biomaterials: Rational Design, Synthetic Pathway, and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 12, 1937-1955.

32. Kastle, J.H., Loevenhart, A.S. 1901. On the Nature of Certain Oxidizing Ferments. *American Chemical Journal*, 2, 539–566.

33. Plewig, G., Kligman, A.M. 2012. *Acne and Rosacea* (3 ed.). Springer Science & Business Media., p. 613.

34. Chen, Q., Espey, M.G., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., Corpe, C.P., Buettner, G.R., Shacter, E., Levine, M. 2005. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *PNAS*, 102 (38) 13604-3609.

Pseudoprotein-Based Bionanocomposites Containing Benzoyl Peroxide

Abstract:

The development of new biomedical technologies provides an opportunity to introduce new methods of treatment in medicine. Among them, one of the interesting and promising is the technology of controlled/sustainable release and supply of peroxides and/or oxygen in hypoxia, to improve cell viability and tissues' functions. Many diseases or medical procedures require increased oxygenation. Oxygen delivery can reduce cell apoptosis, necrosis and failure of tissue formation (especially during transplantation). The presented work deals with the preparation of new nanocomposites based on pseudoproteins with the purpose to provide delivery of oxygen in sustained/controlled release fashion. Among the numerous pseudoproteins previously obtained by us, two poly(ester amide)s labelled as **4F4** and **8L6** and made on the basis of natural α -amino acids phenylalanine and leucine were selected as biodegradable matrices for making the goal nanocomposites containing benzoyl peroxide as a source of oxygen. The influence of various factors on the fabrication of nanocomposites has been studied along with the stability of the obtained composites upon storage.

Keywords: pseudoproteins, nanocomposites, benzoyl peroxides, oxygen-releasing systems;

ავტორები:

დარეჯან ხარაძე - ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის მთავარი მეცნიერ თანამშრომელი, ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი; ელ.ფოსტა: mn.kharadze@gmail.com

თინა ოშიაძე - ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის უფროსი მეცნიერ თანამშრომელი, ქიმიის მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი

ლარისა ყირმელაშვილი - ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის მეცნიერ თანამშრომელი, ქიმიის მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი

თემურ ქანთარია -- საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის ქიმიისა და მოლეკულური ინჟინერიის ინსტიტუტის მეცნიერ თანამშრომელი, ქიმიის მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი

რამაზ ქაცარავა - საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის ქიმიისა და მოლეკულური ინჟინერიის ინსტიტუტის დირექტორი, აკადემიკოსი, ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი;