

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი



ტატა ჯანგველაძე

დაკლასვირის კომპლექსწარმოქმნის კვლევა ზოგიერთ ციკლოდექსტრინთან
ელექტროფორეტული და მიკროკალორიმეტრული მეთოდებით.

ქიმიური ექსპერიზა

ნაშრომი შესრულებულია ქიმიური ექსპერტიზის მაგისტრის
აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები.

საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის აკადემიკოსი, პროფესორი

ბეჟან ჭანკვეტაძე

ქიმიის აკადემიური დოქტორი,

რუსუდან კაკავა

თბილისი

2021

ანოტაცია

სამაგისტრო ნაშრომის მიზანია დაკლასვირის კომპლექსწარმოქმნის უნარის შესწავლა კაპილარული ელექტროფორეზის და მიკროკალორიმეტრული მეთოდების გამოყენებით. მოლეკულის ქირალობას უმეტესწილად განსაზღვრავს მასში ასიმეტრიული ნახშირბადატომის არსებობა. ფარმაკოლოგიურად და ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების უმეტესობა ქირალურია. ქირალური ცენტრის შემცველი სამკურნალო ნივთიერებების ნაწილი გამოიყენება რაცემატის სახით, რომლებიც ენანტიომერების ეკვიმოლური რაოდენობისგან შედგება. ენანტიომერები ხასიათდებიან ერთმანეთის მსგავსი ფიზიკური და ქიმიური თვისებებით, თუმცა ისინი შეგვიძლია განვასხვავოთ პოლარიზებული სინათლის ბრუნვის კუთხის ნიშნის მიხედვით. ენანტიომერები განსხვავებულად მოქმედებენ ბიოლოგიურ ორგანიზმზე, რადგან ისინი ერთმანეთისგან განსხვავდებიან ფარმაკოკინეტიკით, ტოქსიკოლოგიური და ფარმაკოლოგიური მოქმედებით, ასევე განსხვავებულია მათი მოქმედება ცილებთან და რეცეპტორებთან. სწორედ ამიტომ ზოგიერთი სამკურნალო საშუალება იწარმოება ერთი ენანტიომერის სახით.

ადამიანის ორგანიზმი მძლავრ ქირალურ სელექტორს წარმოადგენს, ხოლო ენანტიომერები განსხვავებული ურთიერთქმედებით ხასიათდებიან ქირალური სელექტორის მიმართ, ამიტომ გამოიწვევს განსხვავებულ ფარმაკოლოგიურ ეფექტს. შესაბამისად, ეფექტი ერთი იზომერის შემთხვევაში შეიძლება იყოს სასურველი ფარმაკოლოგიური მოქმედება, ხოლო მეორე იზომერის შემთხვევაში კი ტოქსიკური მოქმედება. სწორედ ამიტომ არის მნიშვნელოვანი ენანტიომერების დაყოფა და მათი მოქმედების შესწავლა.

ქირალური ნივთიერებების დაყოფის მნიშვნელოვან მეთოდს წარმოადგენს კაპილარული ელექტროფორეზი. ამ მეთოდში ენანტიომერული დაყოფა შესაძლებელია ქირალური სელექტორების გამოყენებით. ქირალურ სელექტორებად უმეტესად გამოყენებულია ციკლოდექსტრინები, რომლებიც ენანტიოსელექტიურად გამოიცნობენ ენანტიომერებს გარდამავალი არაკოვალენტური დიასტერეომერული კომპლექსების წარმოქმნის გზით.

კომპლექსწარმოქმნის მექანიზმის დასადგენად მნიშვნელოვანია თერმოდინამიკური პარამეტრების და მდგრადი კომპლექსის წარმოქმნისთვის საჭირო პირობების შესწავლა.

იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრული მეთოდის საშუალებით ჩვენ შეგვიძლია პირდაპირი გზით განვსაზღვროთ თერმოდინამიკური მახასიათებლები: ენთალპია, ენტროპია, გიბსის თავისუფალი ენერგია და აქტიური ცენტრების რიცხვი. მეთოდის უპირატესობას წარმოადგენს ნივთიერებების მცირე დანახარჯი და ტექნიკური სიმარტივე.

ჩვენი კვლევა ეხება დაკლასვირის კომპლექსწარმოქმნის უნარს ზოგიერთ ციკლოდექსტრინთან. დაკლასვირი წარმოადგენს HCV- ვირუსის 1 და 4 გენოტიპის სამკურნალო პრეპარატს, რომელმაც კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტში, ზოგიერთ ციკლოდექსტრინთან აჩვენა საკმაოდ უცნაური ქცევა.[1] ექსპერიმენტში ასახულია პლატოს ფენომენი, რაც დიდ ყურადღებას იქცევს. პლატოს ფენომენი ასახავს ნელ წონასწორობას, რაც არ არის დამახასიათებელი კაპილარული ელექტროფორეზისთვის. ჩვენი მიზანი იყო კაპილარული ელექტროფორეზის უკვე არსებული შედეგების შედარება მიკროკალორიმეტრული მეთოდის შედეგებთან.

ანალიზის პროცესში გამოვიყენეთ: β - ციკლოდექსტრინი, γ - ციკლოდექსტრინი, ასევე ჰეპტაკის-2,3- დი- O -მეთილ- β - ციკლოდექსტრინი.

Summary

Study of complex formation between daclatasvir and some cyclodextrins using capillary electrophoresis and microcalorimetry

The goal of the present master thesis was to study the formation of Daklatasvir complex with cyclodextrins (CD) using capillary electrophoresis and microcalorimetric methods. Almost half of the drugs currently used in therapy have a chiral center in their molecule. Part of the chiral drugs are used in the form of racemates, which consist of an equimolar mixture of enantiomers. The enantiomers have the same physical and chemical properties in achiral environment and only way to distinguish between them in such environment is the sign of rotation angle of polarized light. Enantiomers act differently on biological organisms because they differ from each other in pharmacokinetics, toxicological and pharmacological action, as well as their action on proteins and receptors. These differences in interactions lead to differences in the biological activities. The living body with its numerous homochiral compounds being amazingly chiral selector, will interact each racemic drug differently and metabolize each enantiomer by a separate pathway to generate different pharmacological activity. This is why it is important to separate enantiomers and study their action.

One of the methods of separation enantiomers is Capillary electrophoresis (CE). Separation of enantiomers in CE is achieved by using chiral selectors. CDs are important and frequently used class chiral selectors because they are non-toxic and multimodal selectors, since multiple chiral interactions are possible through very different stereoselective mechanisms. CDs are very convenient to use because of their solubility in aqueous solutions.

In order to determine the mechanism of complex formation, it is important to study the thermodynamic parameters and the conditions required for the formation of a stable complex.

Using the isothermal titration calorimetry (ITC) one can directly determine the stoichiometry of complexes and thermodynamic parameters of complex formation, such as enthalpy, entropy, Gibbs free energy...

Daclatasvir (DCV) is a direct-acting antiviral agent against Hepatitis C Virus (HCV) used for the treatment of chronic HCV genotype 1 and 4 infection. It is marketed under the name DAKLINZA and is contained in daily oral tablets as the hydrochloride salt. It exerts its antiviral action by preventing RNA replication via binding to NS5A, a nonstructural phosphoprotein encoded by HCV.

In the present work we studied formation of DCV complex with various CDs by the ITC method.

შინაარსი

ანოტაცია.....	2
შინაარსი.....	6
1. შესავალი.....	8
2. ლიტერატურული ნაწილი.....	10
2.1. კაპილარული ელექტროფორეზის ისტორია და გამოყენება.....	10
2.2. ელექტროფორეტული ძვრადობა.....	11
2.3. ელექტროსმოსი.....	13
2.4. კაპილარული ელექტროფორეზის ხელსაწყო აგებულება.....	16
2.5. კაპილარული ელექტროფორეზის უპირატესობები.....	17
2.6. ციკლოდექსტრინები.....	19
2.7. ქირალურ ნივთიერებათა დაყოფა კაპილარულ ელექტროფორეზში.....	21
2.8. C ₃ ჰეპატიტი.....	22
2.9. დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდი.....	23
2.10. კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტის შედეგები და დისკუსია.....	25
2.10.1. ექსპერიმენტის შედეგები: [1].....	26
2.11. იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრული მეთოდი.....	32
2.12. ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის ურთიერთქმედების თერმოდინამიკური პარამეტრები.....	33
2.13. იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრის ხელსაწყო.....	37
3. იზოთერმული ტიტრაციის ექსპერიმენტი.....	38
3.1. ექსპერიმენტში გამოყენებული ნივთიერებები.....	38
3.2. ექსპერიმენტის პირობები :.....	39
4. ექსპერიმენტით მიღებული შედეგების განსჯა.....	40
4.1 0.2 მილიმოლური DCV და β-CD.....	40

4.2	0.5 მილიმოლური DCV და β -CD	42
4.3	DCV და γ -CD.....	45
5.	დასკვნები.....	47
6.	გამოყენებული ლიტერატურა	48

1. შესავალი

სამკურნალწამლო ნივთიერებების უმეტესი ნაწილი მოლეკულაში შეიცავს ქირალურ ცენტრს. პირველად მოლეკულური ქირალობა 1848 წელს აღმოაჩინა ლუის პასტერმა, ღვინის მჟავას ენანტიომერების დაყოფით [2]. სულ უფრო მეტად ვითარდება ქირალური პრეპარატების მოქმედების შესწავლა. მიუხედავად ენანტიომერების მსგავსი სტრუქტურული ფორმულისა, ქირალურ გარემოში მათი მოქმედება მკვეთრად განსხვავებულია, ასევე განსხვავებულია მათი ფარმაკოკინეტიკა, ტოქსიკურობა და ბიოლოგიური აქტივობა. [3] ამის გამო ზოგიერთი პრეპარატი იწარმოება ერთი, დადებითი თერაპიული მოქმედების ენანტიომერის სახით. გარდა ამისა ცნობილია რომ ფერმენტები, ცილები, ნახშირწყლები ამინომჟავები, ალკალოიდები და ჰორმონები ქირალურია. რის შედეგადაც იზრდება ქირალური ნივთიერებების ენანტიომერულად სუფთა სახით რეალიზაციის და წარმოების ტენდენცია.

ენანტიომერების დასაყოფად წარმატებით გამოიყენება არაერთი ინსტრუმენტული მეთოდი. შედარებით ახალ, თუმცა საკმაოდ მძლავრ და ფართოდ გამოყენებად მეთოდს წარმოადგენს კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდი, რომელიც თავდაპირველად ცილების და ნუკლეინის მჟავების ანალიზისთვის გამოიყენა ჰერტენმა 1965 წელს.

დღესდღეობით, კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდით შესაძლებელია, როგორც ენანტიომერების დაყოფა ასევე არაკოვალენტური ურთიერთქმედების მექანიზმების კვლევა. კაპილარულ ელექტროფორეზში ენანტიომერების დაყოფა მიიღწევა ქირალური სელექტორის გამოყენებით. მეთოდი გამოირჩევა რიგირ უპირატესობებით, სხვა მეთოდებთან შედარებით. კაპილარული ელექტროფორეზის უპირატესობებია : მაღალი ეფექტურობა (თეორიული თევშების მაღალი რიცხვი), კარგი გარჩევითობა, რეაქტივების მინიმალური დანახარჯი, ანალიზის მცირე დრო, სიმარტივე და უნივერსალურობა.

ქირალური ნივთიერებების კომპლექსწარმოქმნის მექანიზმის შესასწავლად გამოიყენება იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრი. მეთოდის საშუალებით იზომება, კომპლექსწარმოქმნის რეაქციის შედეგად გამოყოფილი ან შთანთქმული სითბო. იზოთერმული ტიტრაციის მეთოდი წარმოადგენს საკმაოდ მაღალმგრძობიარე მეთოდს, რომელიც საშუალებას გვაძლევს პირდაპირი გზით განვსაზღვროთ ისეთი მნიშვნელოვანი პარამეტრები როგორცაა: ენთალპია ΔH , ენტროპია ΔS , კომპლექსწარმოქმნის მუდმივა K , გიბსის თავისუფალი ენერჯია ΔG .

ჩვენი კვლევის მიხედვით შევისწავლეთ დაკლასვირის კომპლექსწარმოქმნის მექანიზმი მიკროკალორიმეტრული მეთოდის გამოყენებით.

Daklinza წარმოადგენს HCV ვირუსის სამკურნალო პრეპარატს, რომელიც მაღალი ეფექტურობით ჩაანაცვლებს დღესდღეობით გამოყენებულ პრეპარატებს. მას აქვს ანტივირუსული ეფექტი და მომქედებს, C ჰეპატიტის ვირუსის მაპროვოცირებელ არასტრუქტურულ ცილაზე NS5A_ზე, როგორც ინჰიბიტორი. პრეპარატ Daklinza_ს მოქმედ საფუძველს წარმოადგენს დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდი.

დაკლასვირი არის ენანტიომერულად სუფთა ორი ქირალური ცენტრის შემცველი ნივთიერების სახელწოდება (ნახ. 18). გარდა დაკლასვირისა, ამ ნივთიერებას გააჩნია კიდევ 3 სტერეოიზომერი. ჩვენი ჯგუფის მონაწილეობით ცოტა ხნის წინ განხორციელებულ ერთ-ერთ კვლევაში შეისწავლებოდა დაკლასვირის და მისი ენანტიომერის დაყოფა კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდის გამოყენებით. ამ ექსპერიმენტებში დაკლასვირი და მისი ენანტიომერი ზოგიერთი ციკლოდექსტრინის გამოყენებით ერთმანეთისგან დაიყო, ზოგიერთი ციკლოდექსტრინის გამოყენებით არ დაიყო ხოლო ზოგიერთი ციკლოდექსტრინის თანაობისას წარმოიქმნა პლატო ენანტიომერებს შორის [1]. პლატო წარმოიქმნა თავისთავად ნელ წონასწორობას ასახავს. ენანტიომერულად სუფთა დაკლასვირზე და მის ენანტიომერზე ჩატარებულმა კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ პლატოს წარმოქმნა ამ დროსაც ხდება და ამგვარად არ არის დაკავშირებული ენანტიომერების დაყოფის პროცესში მიმდინარე თეორიულად შესაძლო ენანტიომერიზაციის პროცესთან. მსგავსი ფენომენი არ არის კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდისთვის დამახასიათებელი, რის გამოც აქტუალური გახდა დაკლასვირისა და ციკლოდექსტრინებს შორის კომპლექსწარმოქმნის თერმოდინამიკური პარამეტრების კვლევა. ჩვენ სხვადასხვა ციკლოდექსტრინთან გამოვიკვლიეთ დაკლასვირის არასტანდარტული ქცევა იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრული მეთოდით, რომლის შედეგებსად დეტალურად განვიხილავთ წინამდებარე ნაშრომში.

2. ლიტერატურული ნაწილი

2.1. კაპილარული ელექტროფორეზის ისტორია და გამოყენება.

კაპილარული ელექტროფორეზი არის ნივთიერებათა დაყოფის ელექტროკინეტიკური მეთოდი, რომლის სიტემაც შექმნა ჰერტენმა 1965 წელს. მეთოდი პირველად გამოიყენეს ცილების, ნუკლეინის მჟავების და არაორგანული იონების დასაყოფად. მოგვიანებით, კერძოდ 1980 წელს ამ მეთოდის პოტენციალი აღმოაჩინეს ჯორგენსონმა და ლუკასმა, მაშინ როდესაც პირველად გამოაქვეყნეს მაღალეფექტური დაყოფები.[4] რაც შეეხება ფარმაცევტულ ინდუსტრიას, აქ კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდი მე-20 საუკუნის ბოლოდან დაინერგა. ცილების და ნუკლეინის მჟავების გარდა ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა განალიზებული იქნას ნივთიერებათა საკმაოდ ფართო კლასი. ეს ეხება როგორც მცირე ზომის ორგანულ და არაორგანულ ნივთიერებებს, ასევე დიდი ზომის მოლეკულებს. მეთოდი ასევე დიდი წარმატებით გამოიყენება მცირე ზომის ქირალური მოლეკულებისთვის, პრეპარატებში აქირალური მინარევების განსაზღვრისთვის, ასევე მეტალთა იონების განსაზღვრისთვის და ასე შემდეგ.

კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდმა ცალკეულ ანალიზებში ჩაანაცვლა

ტრადიციული გელ-ელექტროფორეზი და ქრომატოგრაფიული მეთოდები. ამ მეთოდის სახეთა მრავალფეროვნება საშუალებას გვაძლევს, რომ მეთოდი გამოვიყენოთ სხვადასხვა ტიპის ანალიზებში.

დაყოფის პროცესს კაპილარულ ელექტროფორეზში განაპირობებს ნაწილაკებს შორის განსხვავებული ელექტროფორეტიული ძვრადობა. [5] ასეთი სახის განსხვავებების მიზეზი შეიძლება იყოს ნივთიერებების განსხვავებული მასა, მუხტი, ან სტრუქტურა.

ნაწილაკის ძვრადობაზე ნივთიერების სტრუქტურას ცალსახა, ცხადი გავლენა არ აქვს, თუმცა ნაწილაკის ეფექტური მუხტი, ბუფერთან სოლვატაცია და დენის ნაკადისადმი მდგრადობა დამოკიდებულია ნივთიერების სტრუქტურაზე. კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდში შესაძლებელია ერთსა და იმავე პირობებში ერთმანეთისგან დაიყოს, როგორც დადებითად და უარყოფითად დამუხტული ასევე ნეიტრალური ნაწილაკები.

2.2. ელექტროფორეტული ძვრადობა

კაპილარული ელექტროფორეზი არის ნივთიერებათა დაყოფის ელექტროკინეტიკური მეთოდი, რომელიც ეფუძნება დამუხტული ნაწილაკების განაწილებას ბუფერულ ხსნარში მათი განსხვავებული ელექტროფორეტული ძვრადობების შესაბამისად. იმისათვის რომ ასეთ განაწილებას მივაღწიოთ, საჭიროა კაპილარის ბოლოებზე ელექტრული ველის მოდება.

აქედან გამომდინარე, ელექტროფორეტული ძვრადობა ძირითად როლს თამაშობს ნაწილაკთა დაყოფებში. იმის გამო, რომ ელექტროფორეტული ძვრადობა დამახასიათებელია დამუხტული ნივთიერებისთვის და აღიძვრება ელექტროლიტის გარემოში, ნივთიერებათა დაყოფის მისაღწევად ძალიან დიდი მნიშვნელობა აქვს ელექტროლიტის ხსნარის ისეთ მახასიათებლებს როგორცაა: pH, იონების ტიპი და იონური ძალა. [5]

მუდმივი ელექტრული ველის გამოყენების პირობებში E, დამუხტული ნაწილაკები განიცდიან ელექტროსტატიკური ძალის მოქმედებას- F_e , რომელიც პროპორციულია ელექტრული ველის ძალის და იონის მუხტის:

$$F_e = qE \quad (1)$$

სწორედ ეს მიზეზი აჩქარებს იონის გადაადგილებას საწინააღმდეგოდ დამუხტული ელექტროდისკენ. ასეთ დროს მნიშვნელოვანია ხახუნის სიბლანტე, რადგან თუ ანალიზი ტარდება ბლანტ გარემოში, მაშინ ხახუნის ძალის გამო ნაწილაკების გადაადგილება ფერხდება, რაც თავის მხრივ იწვევს ნაწილაკების ელექტროდისკენ გადაადგილების შეწყვეტას.

სტოკის მიხედვით, ხახუნის ძალა სფერული ნაწილაკებისთვის ასე გამოისახება:

$$F_f = 6\pi\eta vr \quad (2)$$

სადაც η არის სითხის სიბლანტე; v - მიგრაციის სიჩქარე; r -იონის ან ნაწილაკის რადიუსი. დამუხტული ნაწილაკის გადაადგილება მუდმივი სიჩქარით დაიწყება იმ მომენტიდან, როდესაც (1) და (2) ფორმულებით გამოხატული ძალები ერთმანეთს გაუტოლდება და ნაწილაკზე მოქმედი ძალების ტოლქმედი იქნება ნულის ტოლი. ეს ნიუტონის მეორე კანონის თანახმად ნიშნავს, რომ აჩქარების მნიშვნელობა გაუტოლდება ნულს და ნაწილაკი იმოდრავებს მუდმივი სიჩქარით. იმ იონების მუდმივი სიჩქარე, რომლებიც კაპილარში გადაადგილდებიან გამოისახება, როგორც ელექტროფორეტული ძვრადობის და μ ელექტრული ველის E ნამრავლი:

$$v = \mu_e E \quad (3)$$

თუ (1),(2) და (3) განტოლებებს გავაერთიანებთ და ყველა აღნიშნული პარამეტრს გავითვალისწინებთ, შევძლებთ ელექტროფორეტული ძვრადობის ფორმულის გამოსახვას, რასაც შემდეგი სახე აქვს:

$$\mu_e (cm^2 V^{-1} s^{-1}) = \frac{q}{\pi \eta z} = \frac{v}{E} \quad (4)$$

ელექტროფორეტული ძვრადობა, ეს არის იონის მახასიათებელი სიდიდე მოცემულ პირობებში, როგორც გამოსახულებიდან ჩანს, მოცემული იონური ნივთიერებისთვის μ_e

იზრდება დისოციაციის ხარისხის ან იონური მუხტის გაზრდასთან ერთად. აღსანიშნავია, რომ მოცემული იონის მუხტისთვის q , რაც უფრო იზრდება იონის მასა მით მეტად იკლებს მისი მიგრაციის სიჩქარე.

გარდა ამისა უნდა აღინიშნოს, რომ ნეიტრალური ნივთიერებებისთვის $q = 0$, ე.ი.

მათ არ გააჩნიათ ელექტროფორეტული ძვრადობა. ამიტომ გვჭირდება ძალა, რომელიც პასუხისმგებელი იქნება ნეიტრალური ნივთიერებების ძვრადობაზე კაპილარულ ელექტროფორეზში. ასეთი კი არის ელექტროოსმოსი ან ელექტროოსმოტური ნაკადი, რომელიც განსაზღვრავს ნეიტრალური ნივთიერებების ძვრადობას.

2.3. ელექტროსმოსი

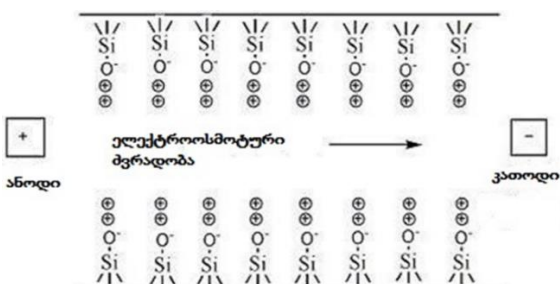
პირველი კვლევები ელექტროსმოსის ფენომენზე ეკუთვნის ჰელმჰოლცს, რომელმაც თავდაპირველად ჰორიზონტალურ მდგომარეობაში მყოფ წყლიანი ფაზით შევსებულ კვარცის კაპილარს, რომელიც შეიცავდა დამუხტულ ნაწილაკებს, ბოლოებზე მოსდო ძაბვა.[5] კაპილარის შიდა კედელი ძაბვის მოდების შემდეგ დაიმუხტა უარყოფითად, ხოლო გამხსნელის ფენამ, რომელიც იმყოფებოდა კედელთან და მასში არსებულმა ნაწილაკებმა შეიძინა საპირისპირო მუხტი. სითხემ, რომელიც იმყოფებოდა მილში, ამ პროცესის შედეგად დაიწყო გადაადგილება საწინააღმდეგოდ დამუხტული ელექტროდის მიმართულებით, სწორედ ამ პროცესს ელექტროსმოსი ეწოდება, ხოლო ხსნარის ელექტროსმოტური ძვრადობა აღიწერება შემდეგი გამოსახულებით (5):

$$\mu EOF = \frac{E \zeta \epsilon}{4 \eta \pi} \quad (5)$$

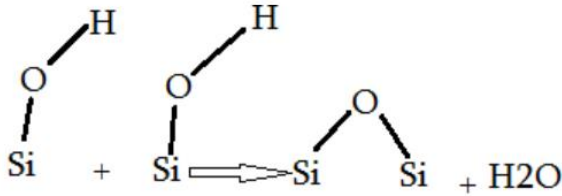
გამოსახულებიდან ჩანს, რომ ელექტროსმოტური ძვრადობა აღიწერება, როგორც ფუნქცია, რომელიც პირდაპირპროპორციულია ხსნარის მოდებული ელექტრული ველის, დიელექტრიკული მუდმივასი და ზეტა პოტენციალის, ხოლო უკუპროპორციულია ხსნარის სიბლანტის.

რაც შეეხება კაპილარში ბუფერული ხსნარის ძვრადობას, ამ პროცესს აღწერს შტერნის ორმაგი შრის მოდელი [6] (ნახ.4) . თითქმის ყველა მყარი ზედაპირი იძენს ელექტრულ მუხტს ზედაპირზე. მუხტის წარმომავლობის მიზეზი შეიძლება იყოს მყარი ზედაპირის იონიზაცია (ნახ.1) ან მყარ ზედაპირზე ელექტროლიტთა იონების ადსორბცია.

კაპილარული ელექტროფორეზისთვის გამოიყენება კვარცისგან დამზადებული კაპილარები დაუმუშავებელი ზედაპირით, ასეთი მოდელი აღწერს კვარცის კაპილარის შიდა ზედაპირის იონიზაციას. კაპილარების გამოდნობა ხდება 1100°C -სა და უფრო მაღალ ტემპერატურაზე. ასეთ დროს ხდება კვარცის სილანოლური ჯგუფები კონდენსირება (ნახ.2):



ნახ.1 ელექტროსმოსური ძვრადობის სქემატური გამოსახულება

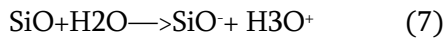


ნახ 2. სილანოლური ჯგუფების კონდენსაცია

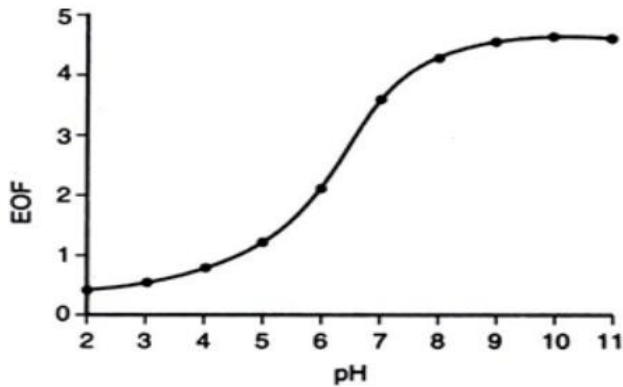
ამ დროს წარმოიქმნება დაჭიმული სილოქსანური ბმები. მას შემდეგ, როდესაც კვარცის კაპილარში გაატარებენ წყლიან ფაზას, ხსნარის კაპილარის კედლებთან კონტაქტისას სილოქსანური ბმები აღდგება კვლავ სილანოლურ ჯგუფებად ჰიდროლიზის საშუალებით, რომლებიც შემდგომ განიცდიან იონიზაციას. ელექტროლიტური გარემოს pH-ზე დამოკიდებულებით სილანოლური ჯგუფები შესაძლოა იყოს დადებითად დამუხტული, როგორც SiOH^+ :



როდესაც $\text{pH} < 2$, მაშინ კვარცის კედლები ნეიტრალურია, რადგან ამ დროს სილანოლური ჯგუფების დისოციაცია ძალიან არის შემცირებული. იმ შემთხვევაში, როდესაც $\text{pH} > 2$, ხდება სილანოლური ჯგუფების დეპროტონირება:



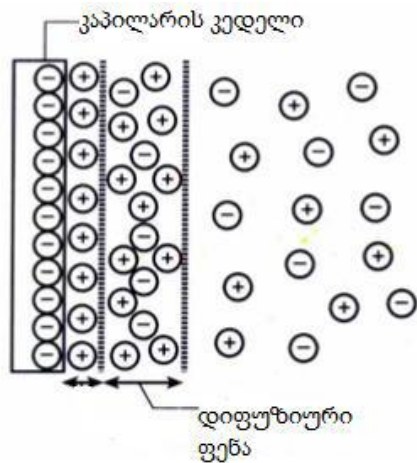
თუ ხსნარის pH სიდიდეს გავზრდით ეს გამოიწვევს სილანოლური ჯგუფების დისოციაციის ხარისხის გაზრდას. ელექტროსმოტური ძალა მაქსიმალურ სიდიდეს აღწევს, მაშინ როდესაც ხსნარის $\text{pH} = 8.0$, ხოლო pH -ის შემდგომი გაზრდის შემთხვევაში ელექტროსმოტური ნაკადის ძალა მუდმივი რჩება (ნახ. 3).



ნახ.3 ელექტროოსმოსური ძვრადობის Ph-ზე დამოკიდებულების გრაფიკი.

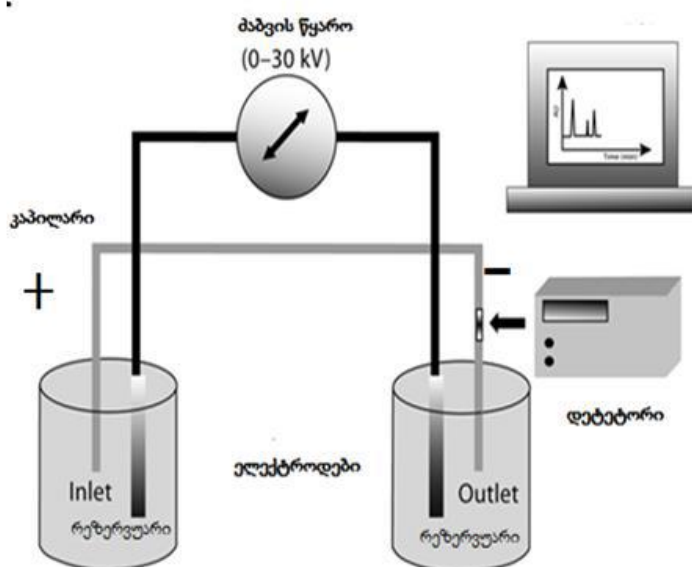
მაშინ როდესაც კაპილარის კედელი უარყოფითად არის დამუხტული, ის ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედების საშუალებით იზიდავს დადებითად დამუხტულ ჰიდროქსონიუმის იონებს, რის შედეგადაც ხდება ზედაპირის უარყოფითი მუხტის დაბალანსება. შტერნის მოდელის (ნახ. 4) მიხედვით ორმაგი შრე, იონებით ადსორბირებული, წონასწორობაშია გარეთა დიფუზიურ ფენასთან. დიფუზიურ ფენაში, კედლიდან დაშორების ანუ მანძილის გაზრდასთან ერთად ელექტრული პოტენციალი იკლებს წრფივად.

დიფუზიური ორმაგი შრის პოტენციალს კი ეწოდება ზეტა პოტენციალი, ხოლო წარმოსახვითი საზღვარი მკაცრად განსაზღვრულ ფენას და დიფუზიურ ფენას შორის, ცნობილია როგორც გამყოფი ზედაპირი. აღსანიშნავია, რომ დიფუზიურ ფენაში ყოველთვის ჭარბობს დადებითი მუხტი, ხოლო ელექტრული ველის მოდების შემდეგ დადებითად დამუხტული იონები იწყებენ გადაადგილებას კათოდისკენ. ნაკადის სიჩქარე კედელთან ნულს უტოლდება, ამის მიზეზი არის კედელთან არსებული ხსნარის გარკვეული ნაწილის ხახუნი, მანძილის გაზრდით მისი სიჩქარე იზრდება ორმაგი შრის რეგიონში და მაქსიმუმს აღწევს კედლიდან გარკვეულ მანძილზე, თუმცა ეს მანძილი კედელთან ძალიან ახლოს არის, ხსნარის ეს ნაწილი ამის გამო მიგრირდება მაქსიმალური სიჩქარით.



ნახ.4 შტერნის ორმაგი ელექტრული შრის მოდელი.

2.4. კაპილარული ელექტროფორეზის ხელსაწყოთა აგებულება



ნახ.5 კაპილარული ელექტროფორეზის ხელსაწყოთა სქემა.

სურათზე მოცემულია კაპილარული ელექტროფორეზის ზოგადი სქემა,

რომელიც შედგება შემდეგი კომპონენტებიდან :

1. ვიწრო დიამეტრის მქონე კაპილარი სადაც დაყოფა ხდება ერთ ფაზაში.
2. პლატინის ელექტროდი
3. მაღალი ძაბვის წყარო

4. Inlet და outlet რეზერვუარები. მათში მოთავსებულია ბუფერული ან ქირალური სელექტორიანი ბუფერული ხსნარები.

5. დეტექტორი

6. ჩამწერი

ანალიზის პროცესში გამოყენებული მაღალი ძაბვის წყარო, რომელიც საშუალებას იძლევა ანალიზი ჩატარდეს 30kv_ მდე ძაბვის ქვეშ, დაკავშირებულია პლატინის ორ ელექტროდთან, რომლებიც ბუფერულ ხსნარშია ჩაშვებული. აგრეთვე ორ ბუფერულ ხსნარშია (inlet და outlet ბოთლებში) ჩაშვებული კაპილარის ბოლოები, რომელთა შიდა დიამეტრიც 20-100 მკმ_ს შეადგენს. კაპილარები, რომლებიც კაპილარულ ელექტროფორეზში გამოიყენება, გარედან დაფარულია პოლიიმიდის ფენით, რაც ზრდის კაპილარის მოქნილობას. Outlet ბოთლის მხრიდან დეტექტირების არხამდე დაახლოებით 9 სმ სიგრძეზე კაპილარს უკეთდება დეტექტირების ფანჯარა, დაახლოებით 4-5 მმ სიგრძის პოლიიმიდის მოწვის ხარჯზე. სწორედ დეტექტირების ფანჯარაში ხდება ნივთიერების დეტექტირება. ამ მიზნით ყველაზე ხშირად გამოყენებულია დეტექტორი ულტრაისფერი გამოსხივებით, რომლის ნათურაც დაყენებულია დეტექტირების ფანჯრის პირდაპირ და მისი გამოსხივება დეტექტირების ფანჯარაში გამავალ ნივთიერებებს უმზერს. მიღებული სიგნალები კი ელექტრობულად ჩაიწერება და გამოისახება პიკების სახით.

2.5. კაპილარული ელექტროფორეზის უპირატესობები

დაყოფის ისეთ წამყვან მეთოდებთან შედარებით, როგორცაა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია, გაზური ქრომატოგრაფია და სხვა, კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდს გააჩნია გარკვეული უპირატესობები.

კაპილარული ელექტროფორეზის უპირატესობები შემდეგში მდგომარეობს: [7,8]

1. კაპილარები ხასიათდებიან მაღალი ელექტრული მდგრადობით, რაც საშუალებას იძლევა ანალიზები ჩატარდეს მაღალი ელექტრული ველის ქვეშ (100-500 V/cm) მინიმალური სითბოს წარმოქმნით. მაღალი ელექტრული ველის გამოყენება კი განაპირობებს ანალიზის მცირე დროს.

2. კაპილარული ელექტროფორეზი წარმოადგენს დაყოფის მინიატურულ მეთოდს. ამის მიზეზი კი არის ის რომ, კაპილარულ ელექტროფორეზში გამოყენებული კაპილარის შიდა დიამეტრი 25-75 მკმ_ს

უტოლდება. კაპილარის ეს დიამეტრი ჩვეულებრივი მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის სვეტის დიამეტრის დაახლოებით მეათათასედია. კაპილარულ ელექტროფორეზში მიკრო დიამეტრის მქონე კაპილარის გამოყენება ამცირებს, როგორც დიფუზიურ მოვლენებს ასევე ტემპერატურულ სხვაობას, რაც თავის მხრივ განაპირობებს მაღალეფექტური პიკების მიღებას. კაპილარულ ელექტროფორეზში გამოყენებული კაპილარები, განსხვავებით ჩვეულებრივი ქრომატოგრაფიული სვეტისგან, არ არის შევსებული. სწორედ ეს არის განივი დიფუზიის შემცირების მიზეზი. განივი დიფუზია კი დისპერსიის გამომწვევი მთავარი მიზეზია. ზემოთ ხსენებული მიზეზების გამო არ ვხვდებით ზონის გაფართოებებს, მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მსგავსად, ხოლო მიღებული დაყოფები ხასიათდება მაღალი გარჩევითობით და მაღალი ეფექტურობით.

3. მეთოდი იაფი და ეკონომიურია, ამის მიზეზი გახლავთ მიკროდიამეტრის მქონე კაპილარები, რაც უზრუნველყოფს გამხსნელების, ნიმუშების და ქირალური სელექტორების მცირე დანახარჯს.

4. კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდი ნაკლებად აბინძურებს გარემოს, რადგან მეთოდში ძირითადად ვიყენებთ არაორგანულ ბუფერებს.

5. მეთოდში არ არსებობს მკვედარი მოცულობა, ამის მიზეზი არის ერთის მხრივ ნივთიერების ინიცირება მეორეს მხრივ კი დეტექტირება, რაც პირდაპირ კაპილარში მიმდინარეობს.

6. მეთოდის სწრაფი შემუშავების და ოპტიმიზაციის შესაძლებლობა.

7. ქირალური სელექტორების ფართო არჩევანი და მარტივად შეცვლის შესაძლებლობა.

8. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიისა და გაზური ქრომატოგრაფიისგან განსხვავებით კაპილარულ ელექტროფორეზში შესაძლებლობა გვაქვს შევისწავლოთ ისეთი სუსტი ეფექტები, რომელთა შესწავლაც ზემოთხსენებულ მეთოდებში შეუძლებელია.

2.6. ციკლოდექსტრინები

ენანტიომერების დაყოფა კაპილარულ ელექტროფორეზში შესაძლებელია ქირალური სელექტორების გამოყენებით. ქირალურ სელექტორებად კი კაპილარულ ელექტროფორეზში ხშირად გამოიყენება ციკლოდექსტრინები, რომლებიც ციკლურ ოლიგოსაქარიდებს წარმოადგენენ [9]. ციკლოდექსტრინების გამოყენება გარკვეულ უპირატესობებთან არის დაკავშირებული: ისინი ხასიათდებიან ქირალური გამოცნობის უნივერსალური უნარით, არ წარმოადგენენ ტოქსიკურ ნივთიერებებს და ადვილად იხსნებიან წყლიან ბუფერებში. ციკლოდექსტრინები წარმოადგენენ ციკლურ ოლიგოსაქარიდებს და მათი მიღება ხდება, სახამებლის ბაქტერიული გარდაქმნით ან შესაბამისი ფერმენტის მოქმედებით. ციკლოდექსტრინები ინტენსიურად გამოიენება, როგორც ფარმაცევტულ მრეწველობაში, ასევე სხვადასხვა საკვების დანამატის სახითაც.

რადგან ციკლოდექსტრინები მიიღება სახამებლის ბაქტერიული გარდაქმნის შედეგად, ისინი არსებობენ მხოლოდ ერთი ენანტიომერული ფორმის სახით და არ არსებობს მათი ოპტიკური ანტიპოდი. ისინი შედგებიან 1,4-ბმით დაკავშირებული α -D-გლუკოპირანოზის ჯგუფების სხვადასხვა რაოდენობისგან. ციკლოდექსტრინების გარე შრე წარმოადგენს ჰიდროფილურს, ხოლო ღრუ არის ჰიდროფობური. სრულყოფილი ცილინდრული ფორმის ნაცვლად ციკლოდექსტრინებს აქვთ წაკვეთილი კონუსური ფორმა, რაც განპირობებულია გლუკოპირანოზის ციკლების სავარძლისებრი კონფორმაციით. ციკლოდექსტრინების შემადგენლობაში შედის, როგორც პირველადი ასევე მეორეული ჰიდროქსილის ჯგუფები, რომლებიც განლაგებულნი არიან გარე შრეზე. განვიხილოთ თითოეული ჯგუფის მდებარეობა: პირველადი ჰიდროქსილის ჯგუფები მდებარეობენ 6C- მდგომარეობაში ციკლოდექსტრინის ღრუს ვიწრო მხარეს, ხოლო მეორეული ჰიდროქსილის ჯგუფები 2C და 3C მდგომარეობაში ღრუს განიერ მხარეს. რაც შეეხება ცენტრალურ ღრუს, ის წარმოადგენილია ნახშირბადული ჯაჭვის სახით და ერთეული ჟანგბადის სახით გლუკოპირანოზის ნაშთებში, რაც თავის მხრივ არის ციკლოდექსტრინის ღრუს ჰიდროფობურობის მიზეზი.

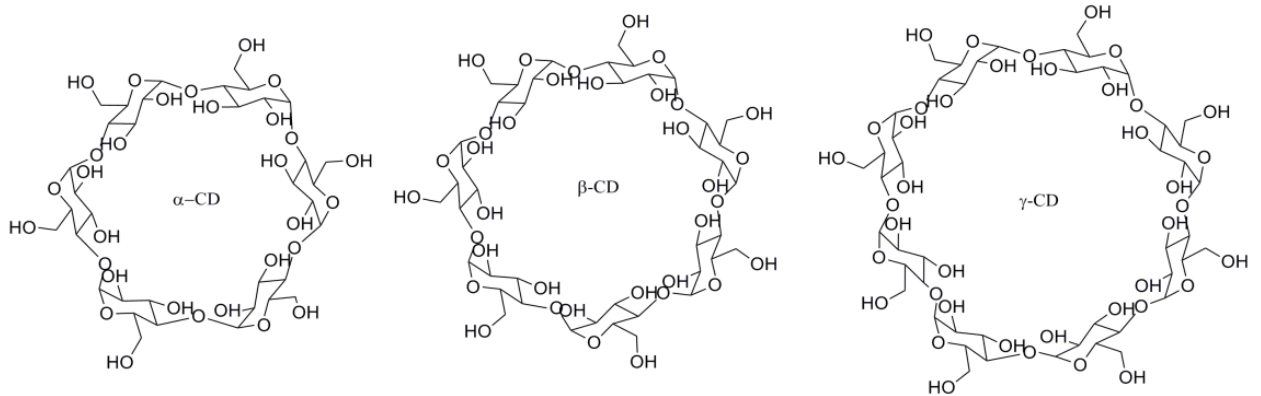
აღსანიშნავია ისიც, რომ ღრუს აქვს ლუისის ფუძის თვისება, რაც გამოწვეულია გლიკოზიდური ჟანგბადის გაუწყვილებელი ელექტრონებით, რომლებიც ორიენტირებული არიან ციკლოდექსტრინის ღრუს ცენტრისკენ.

ციკლოდექსტრინის შემადგენლობაში მყოფი ჰიდროქსილის ჯგუფები, მათი მოდიფიცირების საშუალებას იძლევა. რაც იმას ნიშნავს, რომ შესაძლებელია რომელიმე ჰიდროქსილის ჯგუფის ჩანაცვლება, რომელიმე ფუნქციური ჯგუფით ან ციკლოდექსტრინების მოლეკულის მიბმა სილიკაგელზე, ქრომატოგრაფიული ანალიზებისთვის. [10]

ციკლოდექსტრინების მრავალი სახეობაა ცნობილი, თუმცა ყველაზე ხშირად კაპილარულ ელექტროფორეზში გამოიყენება 6, 7, და 8 გლუკოპირანოზის ჯგუფებისგან შემდგარი α , β და γ ციკლოდექსტრინები. როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ ციკლოდექსტრინების გარკვეულ უპირატესობას წარმოადგენს მათი ხსნადობა წყალხსნარებში, თუმცა უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ ბუნებრივ ციკლოდექსტრინებს და მათ შორის განსაკუთრებით β ციკლოდექსტრინს ახასიათებთ მცირედ ხსნადობა წყალხსნარებში. აციკლურ საქარიდებთან შედარებით ბუნებრივი ციკლოდექსტრინების ნაკლები ხსნადობა წყალხსნარებში, გამოწვეულია შედარებით ძლიერი წყალბადური ბმების არსებობით კრისტალურ ფორმაში. ციკლოდექსტრინების ქირალური მოლეკულების ურთიერთქმედება შესაძლებელია სხვადასხვა სტერეოსელექტიური მექანიზმით. ქირალური გამოცნობის მექანიზმი დაფუძნებულია ციკლოდექსტრინების ღრუში არსებულ ჰიდროფობურ ჯგუფებთან საკვლევი კომპონენტის ჰიდროფობური ნაწილის კონტაზე (ხშირ შემთხვევებში არომატული ბირთვის), ასევე შესაძლოა ადგილი ჰქონდეს წყალბადური ბმის წარმოქმნას და დიპოლ-დიპოლურ ურთიერთქმედებას ციკლოდექსტრინის ჰიდროქსილის ჯგუფებსა და საკვლევი ნივთიერების ქირალურ ცენტრთან არსებულ პოლარულ ნაწილს შორის.

ციკლოდექსტრინები ენანტიოსელექტიურად გამოიცნობენ ენანტიომერებს გარდამავალი არაკოვალენტური დიასტერეომერული კომპლექსების წარმოქმნის გზით. ეს კომპლექსები ერთმანეთისგან განსხვავდებიან სივრცითი ორიენტაციით ან სპეციფიური მოლეკულათაშორისი ურთიერთქმედების ძალებით. ეს არის მიზეზი, რის გამოც ხდება ენანტიომერების დაყოფა და განსხვავება ელექტროფორეტულ ძვრადობებს შორის.

ქირალური გამოცნობის მექანიზმების კვლევებისთვის იდეალურ კომბინაციას წარმოადგენს დაყოფის და სპექტრალური მეთოდების ტანდემი.



ნახ. 6 α , β , γ ციკლოდექსტრინების სტრუქტურული გამოსახულებები.

2.7. ქირალურ ნივთიერებათა დაყოფა კაპილარულ ელექტროფორეზში.

კაპილარულ ელექტროფორეზში დაყოფა დაფუძნებულია საკვლევი კომპონენტების განსხვავებულ ელექტროფორეტულ ძვრადობაზე კაპილარში მოდებული ელექტრული ველის გავლენით. აქირალურ გარემოში ენანტიომერები არ განსხვავდებიან ერთმანეთისგან თავიანთი ელექტროფორეტული ძვრადობით. რაც იმას ნიშნავს, რომ მათი დაყოფა ამ პირობებში შეუძლებელია, ხოლო იმისთვის, რომ მივაღწიოთ ენანტიომერთა დაყოფას კაპილარულ ელექტროფორეზში, აუცილებელია სისტემაში ქირალური სელექტორის გამოყენება. მათ შეუძლიათ ენანტიოსელექტიურად გამოიცილონ ენანტიომერები. დაყოფის წარმოქმნის აუცილებელ პირობას კი წარმოადგენს გარდამავალი/დროებითი არაკოვალენტური დიასტერეომერული კომპლექსების წარმოქმნა.

კომპლექსწარმოქმნა არის წონასწორული პროცესი, ხოლო კაპილარში გადაადგილებისას თავისუფალ მდგომარეობაში მყოფ ნივთიერებას და ქირალურ სელექტორთან ბმულს უნდა გააჩნდეთ განსხვავებული ელექტროფორეტული ძვრადობები. [5,11] თუ პროცესს თეორიულად განვიხილავთ, ენანტიომერების დაყოფა შესაძლებელია მაშინაც, როდესაც შეკავშირების მუდმივები ენანტიომერებსა და ქირალურ სელექტორთან არის ერთი და იგივე, თუმცა დაყოფის მისაღწევად მცირე განსხვავება ეფექტური მუხტის სიმკვრივეებს შორის დიასტერეომერულ კომპლექსებში ყოველთვის არ არის საკმარისი. როგორც ზემოთ ვახსენეთ, ენანტიომერების ელექტროფორეტულ

ძვრადობებს შორის სხვაობა აღიძვრება გარდამავალი დიასტერეომერული კომპლექსების წარმოქმნის ხარჯზე. რადგან დიასტერეომერები ერთნაირი მუხტის სიმკვრივით ხასიათდებიან დაყოფა არ უნდა ხდებოდეს, თუმცა მათი განსხვავებული ორიენტაცია სივრცეში და სპეციფიკური ურთიერთქმედება დიასტერეომერულ კომპლექსებში, განაპირობებს დიასტერეომერების განსხვავებულ ძვრადობას, რაც გამოწვეულია განსხვავებული მუხტის სიმკვრივეებით. იმისათვის, რომ დიასტერეომერების ფუძისეული დაყოფები მივიღოთ ზოგჯერ ისეთი მცირეოდენი განსხვავებებიც არის საკმარისი როგორცაა, მათი სივრცეში სხვადასხვა ორიენტაციით გამოწვეული.

ნივთიერება კაპილარში გარდამავალი კომპლექსის სახით გარკვეულ დროს ატარებს, რაც დამოკიდებულია შეკავშირების მუდმივებზე. ასევე სხვა გარე პარამეტრებზეც, მაგალითად როგორცაა: ქირალური სელექტორის კონცენტრაცია, ტემპერატურა, ხსნარის pH.

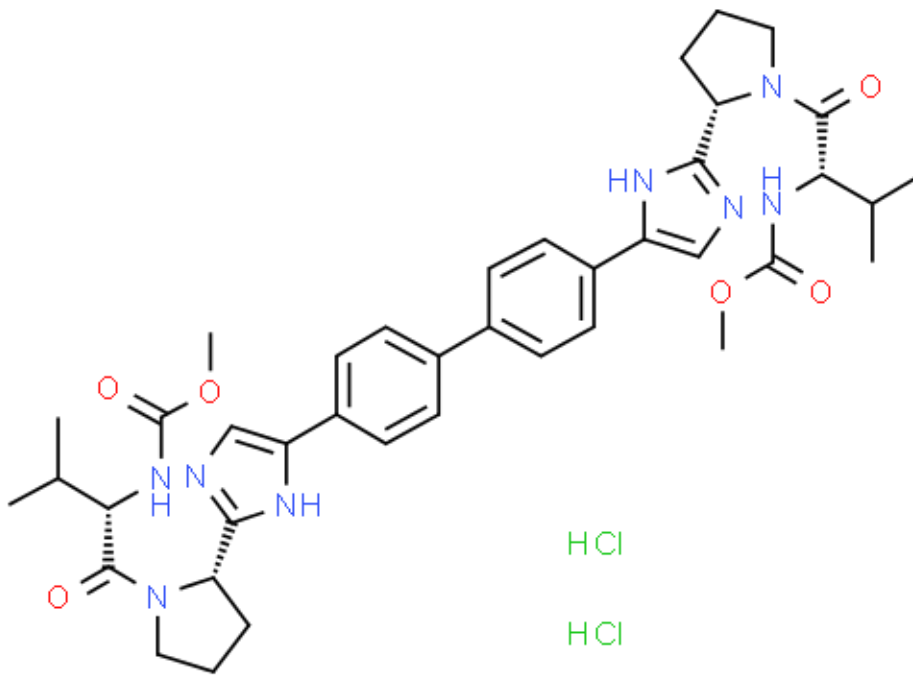
2.8. C_ჰეპატიტი

C_ჰეპატიტის გენომის შესწავლის შედეგად აღმოაჩინეს დიდი პოლიპროტეინის წარმოქმნის პროცესი. დიდ ინტერესს იწვევს C_ჰეპატიტის ვირუსის HCV არასტრუქტურული ცილა 5A (NS5A). აღნიშნული ცილა ფოსფორილირდება მრავალ ადგილას და ურთიერთქმედებს მასპინძელი უჯრედების მემბრანასთან. ის ფუნქციონირებს სხვა ვირუსულ და უჯრედულ ცილებთან ურთიერთქმედების შედეგად. NS5A მრავალი ფოსფო-იზოფორმების სახით არსებობს, რომლებიც ლოკალიზებულია უჯრედის ციტოპლაზმურ/პერინუკლეარულ განყოფილებებში. სწორედ ეს ლოკალიზაცია განაპირობებს მრავალ მასპინძელ უჯრედთან და ვირუსულ ცილებთან ურთიერთქმედებას. მისი ციტოპლაზმურ მემბრანულ სტრუქტურაში ლოკალიზება განაპირობებს C_ჰეპატიტის HCV რეპლიკაციის აუცილებელ კომპონენტს და ახდენს ფართო სპექტრის ეფექტებს უჯრედულ გზებსა და პროცესებზე, მათ შორის თანდაყოლილ იმუნიტეტზე. ქრონიკული HCV_ის შემთხვევაში ლოკალიზებული ვირუსი ინტენსიურად ებრძვის ორგანიზმის იმუნურ სისტემას, რომელიც ცდილობს ვირუსის ელიმინაციას. ამიტომ ასეთი დაავადების არსებობის შემთხვევაში ძალიან მცირეა თვითგამოჯანმრთელების ალბათობა [12].

2.9. დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდი

დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდი DCV წარმოადგენს ერთ-ერთ ოპტიმალურ პერორალურ საშუალებას C ჰეპატიტის ვირუსის აღმოსაფხვრელად. მას აქვს ანტივირუსული ეფექტი და არის არასტრუქტურული ცილის NS5A, ინჰიბიტორი. [13] დაკლასვირით თერაპიის დროს, იმუნურ სისტემაში ფერმენტების დონის მომატების პროცესი იშვიათია და მნიშვნელოვანია, რომ ამ პრეპარატით მკურნალობა დროულად მოხდეს ღვიძლის კლინიკური დაზიანების დროს.

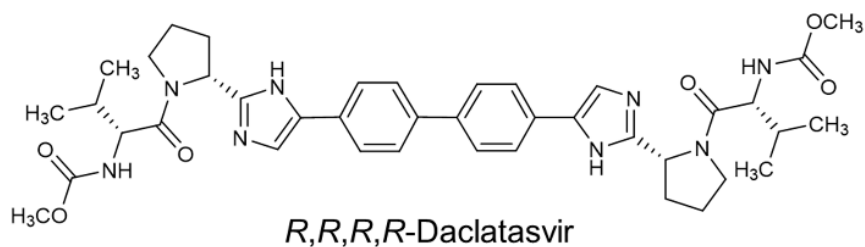
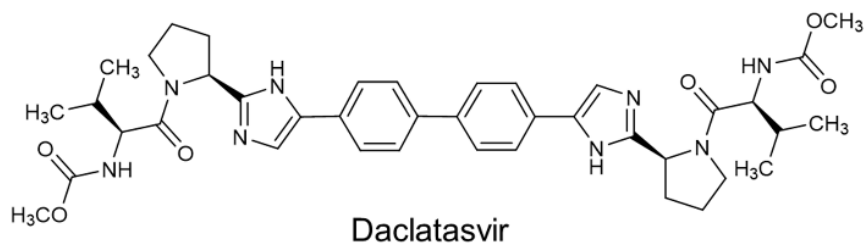
არსებობს C ჰეპატიტის სხვადასხვა გენოტიპი. ეს გულისხმობს ერთი და იგივე ვირუსის სხვადასხვა წარმომავლობას, რომელთაც გენოტიპებს ვუწოდებთ. არსებობს: 1, 2, 3, 4 და 5 გენოტიპი. უნდა აღინიშნოს, რომ დაავადების განვითარებაში გენოტიპს არ აქვს არსებითი მნიშვნელობა, თუმცა მკურნალობის მაქსიმალური ეფექტი სწორედ მასზეა დამოკიდებული. დღესდღეობით პრაქტიკაში უმეტესად გამოიყენება ორი ძირითადი პრეპარატი: პეგილირებული ინტერფერონი, რომელიც ინექციის სახით ინიშნება და რიბავირინი, რომელიც პერორალური გზით მიიღება. უახლოეს მომავალში იგეგმება ინტერფერონის ჩანაცვლება მხოლოდ აბის ფორმის პრეპარატებით. ჩანაცვლების მთავარ მიზანს კი პრეპარატის ეფექტურობის გაზრდა წარმოადგენს. თუ დღესდღეობით HCV_ის მე-2 ან მე-3 გენოტიპის მკურნალობის საუკეთესო შედეგს განკურნების 80% იანი ალბათობა წარმოადგენს, ახალი პრეპარატების გამოყენებით ვარაუდობენ რომ C-ჰეპატიტით დაავადებული პაციენტების 90% სრულად უნდა განიკურნოს. ეს პრეპარატებია: სოფოსბუვირი და დაკლასვირი. ეს კომბინაცია კლინიკურ პრაქტიკაში გაიყიდება Daklinza_ს სახელით და წარმოადგენს ყოველდღიურად მისაღებ პერორალურ ტაბლეტებს, რომელიც C ჰეპატიტის ვირუსის, როგორც ქრონიკული HCV_ს ასევე 1 და 4 გენოტიპის დროს სამკურნალოდ გამოიყენება. [1]



ნახ 7. დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდის სტრუქტურული გამოსახულება

Daclatasvir (DCV, dimethyl N,N'-([1,1'-biphenyl]-4,4'-diylbis[1H-imidazole-4,2-diyl]-[(2S)-pyrrolidine-2,1-diyl][(2S)-3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl])dicarbamate []

დაკლასვირი DCV წარმოადგენს სიმეტრიულ ბიფენილს, რომლის ორივე ნახევარიც ერთნაირია და შეიცავს: იმიდაზოლ- პიროლიდინ- N- მეთოქსიკარბონილ-ვალინის ჯგუფს, ორი სტერეოცენტრით. ფარმაკოლოგიურად აქტიურ ფორმას წარმოადგენს S,S,S,S კონფიგურაციის მქონე სტერეოიზომერი. R,R,R,R კონფიგურირებული ენანტიომერის გარდა არსებობს სხვა დიასტერეომერებიც, მათ შორის მეზო ფორმებიც.[1,16]



ნახ 8. დაკლათასვირი და DCV R,R,R,R-ენანტიომერი

დაკლათასვირის ენანტიომერული დაყოფისთვის მოცემულ კვლევებში [1,16] გამოყენებულ იქნა : ჰეპტაკის (2,6 დი O-მეთილ)-β ციკლოდექსტრინი, ჰეპტაკის(2- O-მეთილ)-β ციკლოდექსტრინი, და β ციკლოდექსტრინი. აღსანიშნავია ასევე ჰეპტაკის (2,3,6 ტრი O-მეთილ)-β ციკლოდექსტრინი და ჰეპტაკის (2,3 დი O-მეთილ)-β ციკლოდექსტრინი, სადაც მიღებული პიკები აღინიშნა პლატოთი, რაც წონასწორობის მაჩვენებელია. ჰეპტაკის (6 O-მეთილ)-β ციკლოდექსტრინთან და ჰეპტაკის (3 O-მეთილ)-β ციკლოდექსტრინთან ანალიზის შედეგები განიერი პიკების სახით იქნა მიღებული. [15]

გარდა ამისა საინტერესოა დაკლათასვირის და γ-ციკლოდექსტრინის ურთიერთქმედება. ამ ურთიერთქმედების დროს დაფიქსირდა ორი პიკი პლატოთი, რაც გარკვეული წონასწორობის მაჩვენებელია დაკლათასვირის კომპლექსებს და თავისუფალ არაკომპლექსურ დაკლათარს შორის. [1]

2.10. კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტის შედეგები და დისკუსია.

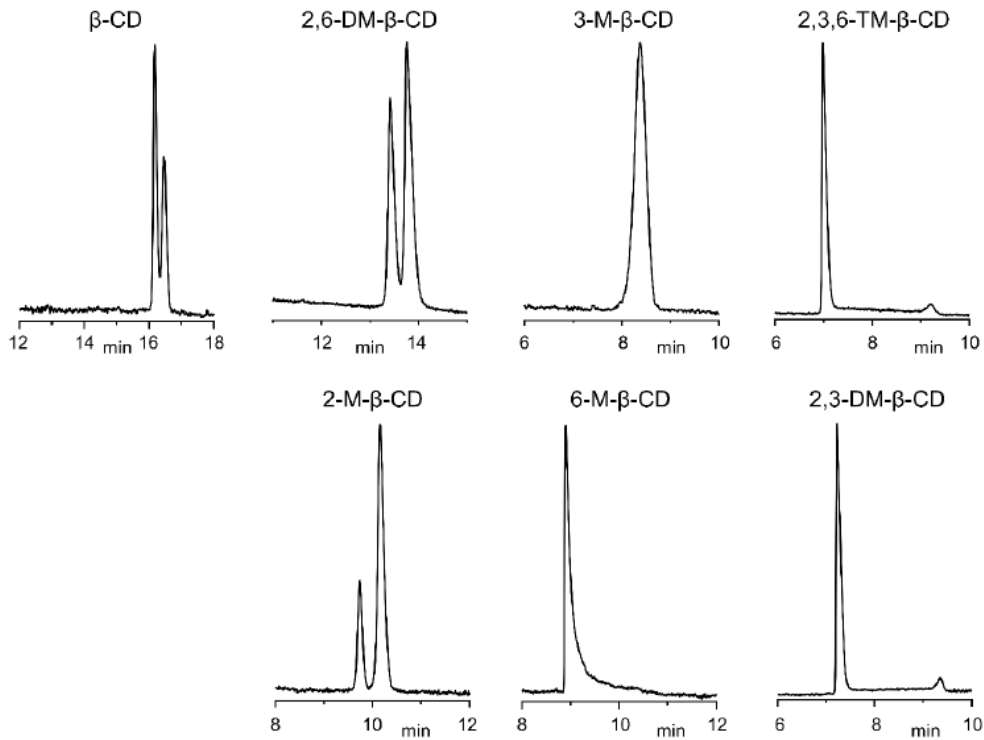
დაკლათასვირის და მისი R,R,R,R-ენანტიომერის დაყოფისთვის გამოყენებული იქნა 50 mM ფოსფატური ბუფერი pH-ით 2.5, ბუნებრივი- β ციკლოდექსტრინი და ცალკეული იზომერული მეთილირებული-β ციკლოდექსტრინი. დაკლათასვირის ენანტიომერული

დაყოფა შესწავლილ იქნა მეთილირებული β - ციკლოდექსტრინის 7 მილიმოლური კონცენტრაციის ხსნარით.

2.10.1. ექსპერიმენტის შედეგები: [1]

ციკლოდექსტრინები შეიძლება დავეოთ სამ ჯგუფად: (1) ენანტიომერული დაყოფა მოხდა 2,6 დიმეთილ- β -ციკლოდექსტრინის და 2-მეთილ- β -ციკლოდექსტრინის თანაობისას.(2) ერთი განიერი პიკი დაფიქსირდა 3-მეთილ- β - ციკლოდექსტრინთან, ხოლო ერთი პიკი განიერი კუდით დაფიქსირდა 6-მეთილ- β -ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში. (3) რაც შეეხება მესამე ჯგუფს 2,3,6-ტრიმეთილ- β - ციკლოდექსტრინის და 2,3-დიმეთილ- β -ციკლოდექსტრინის გამოყენების შემთხვევაში დაფიქსირდა თითო პიკი პლატოთი. ამ უკანასკნელი სელექტორის იდენტური ელექტროფეროგრამები იქნა მიღებული დაკლატასვირის ან R,R,R,R- დაკლატასვირის ანალიზის დროს, ასე რომ ეს ორი პიკი არ წარმოადგენს ენანტიომერებს. β - ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში საჭიროა მაღალი კონცენტრაციები, თუმცა ენანტიომერული დაყოფა ამ შემთხვევაში მოხდა შებრუნებული მიგრაციის რიგით. ამრიგად, კაპილარულ ელექტროფორეზში ციკლოდექსტრინის ნიმუშის ცვლილებამ არსებითი გავლენა მოახდინა ძირითად შედეგებზე. 2 და 3 მდგომარეობაში ჩანაცვლებული ციკლოდექსტრინების გამოყენებისას, როგორც ვთქვით გვაქვს პლატოს ფენომენი, თუმცა თუ ჩამნაცვლებელი გვაქვს მხოლოდ 2 მდგომარეობაში

ამ დროს ხდება ენანტიომერების ჩვეულებრივი დაყოფა პლატოს წარმოქმნის გარეშე. ამასთან β -ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში გამოვლენილი შებრუნებული მიგრაციის რიგი, მიუთითებს იმაზე, რომ ბუნებრივი და მეთილირებული ციკლოდექსტრინები განსხვავებული ქირალობით ხასიათდებიან. ხოლო რაც შეეხებათ ერთდროულ ჩანაცვლებას მე_3 და მე_6 პოზიციებში, ამ შემთხვევაში ენანტიომერული დაყოფა არ ფიქსირდება.



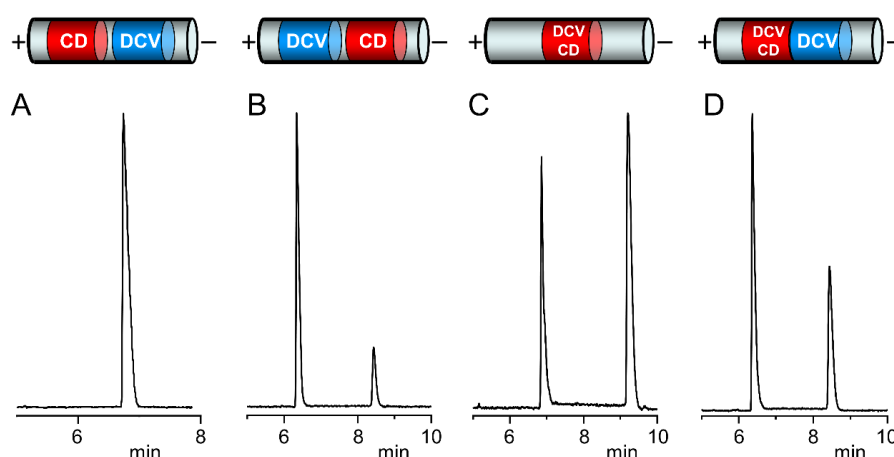
ნახ 9. DCV და RRRR- დაკლატასვირის არარაცემული ნარევის ელექტროფეროგრამები.

ნახაზზე წარმოდგენილია დაკლატასვირის და R,R,R,R- დაკლატასვირის არარაცემული ნარევის ელექტროფეროგრამები. (თანაფარდობით 2:1) ელექტროფეროგრამებზე მითითებული ციკლოდექსტრინების თანაობისას. ექსპერიმენტის პირობები: კაპილარის ეფექტური სიგრძე 40/50.2 სმ, კაპილარის შიგა დიამეტრი 50 მკმ, 50 მილიმოლური ნატრიუმის ფოსფატის ბუფერი pH-2.5; ტემპერატურა 20° C; ძაბვა 25 კვ; ციკლოდექსტრინების კონცენტრაცია; 7 მილიმოლური გარდა β-CD -ისა რომელიც არის 60 მილიმოლური. β-CD- ის შემცველი აქირალური გარემო, რომელიც ასევე შეიცავდა 5 მოლ შარდოვანას

2,6 დიმეთილ β-ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში კონცენტრაციის გაზრდასთან ერთად გაუარესდა ენანტიომერული დაყოფა. განსხვავებული შედეგი აჩვენა ტრიმეთილ β-ციკლოდექსტრინმა, როცა კონცენტრაციის გაზრდით უცვლელი დარჩა ზოგადი ელექტროფეროგრამის სურათი, ცვლილება მხოლოდ აისახა პიკის სიმაღლეზე, სადაც კონცენტრაციის გაზრდამ გამოიწვია პიკის სიმაღლის მატება. საინტერესოა ისიც, რომ პიკის

ასეთივე შედეგი იქნა მიღებული მაშინ, როცა ნიმუშს წარმოადგენდა წინასწარ შერეული დაკლატასვირი და ტრიმეთილ β-ციკლოდექსტინის ნარევი, რომელიც გაანალიზდა აქირალურ გარემოში.

მსგავსი დაკვირვება განხორციელდა დაკლატასვირის და γ-ციკლოდექსტინის ურთიერთქმედების შესწავლისას (Krait et al., 2020). ამ პირობებში პლატოზე დაფიქსირდა ორი პიკი, რომელიც წარმოადგენდა გარკვეულ წონასწორობას დაკლატასვირის კომპლექსებს და თავისუფალ არაკომპლექსურ დაკლატასვირს შორის. აღსანიშნავია, რომ უფრო ადრე მიგრირდნენ კომპლექსები, ხოლო შემდეგ თავისუფალი არაკომპლექსური ფორმები.



ნახ. 10 ქირალური სელექტორის და საანალიზო ნივთიერების დისკრეტული ზონებით განხორციელებული ექსპერიმენტი.

მოცემული ელექტროფეროგრამები გამოხატავს მიგრაციის რიგის ცვლილებას. ინჟექტირება სქემატურად ნაჩვენებია ელექტროფეროგრამების ზემოთ:

(A) DCV > TM-β-CD,

(B) TM-β-CD > DCV,

(C) DCV + TM-β-CD

(D) DCV > DCV + TM-β-CD.

ნიმუშის კონცენტრაცია 200 მკგ/მლ, ხოლო TM-β-CD_ ის კონცენტრაცია 20 მილიმოლური (28,6 მგ/მლ). ექსპერიმენტის პირობები აქაც იგივე რაც ზემოთ განვიხილეთ:

კაპილარის ეფექტური სიგრძე 40/50.2სმ, კაპილარის შიგა დიამეტრი 50 მკმ, 50 მილიმოლური ნატრიუმის ფოსფატის ბუფერი pH-2.5; ტემპერატურა 20°C; ძაბვა 25 კვ; თუ ჩავთვლით, რომ პლატო წარმოადგენს წონასწორულ მდგომარეობას, თავისუფალ და კომპლექსურ ნაერთებს შორის, რაც ნელი პროცესია კაპილარული ელექტროფორეზის დროს, ისევე როგორც γ -ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში. რაც შეეხება კაპილარის ტემპერატურას, ის იცვლება 20° დან 50°C _მდე. ეს მონაცემები მიანიშნებს კაპილარში დინამიურ წონასწორობაზე. დაბალი ტემპერატურის შემთხვევაში მიმოცვლის პროცესი ნელია ხოლო ტემპერატურის მატებასთან ერთად ეს პროცესიც ჩქარდება.

დაკლასავირის მიგრაციის რიგით თავისებურების შესახებ არსებობს სხვა კვლევებიც[1]

ციკლოდექსტრინი კონცენტრაცია დაყოფის ფაქტორი მიგრაციის რიგი კომენტარი

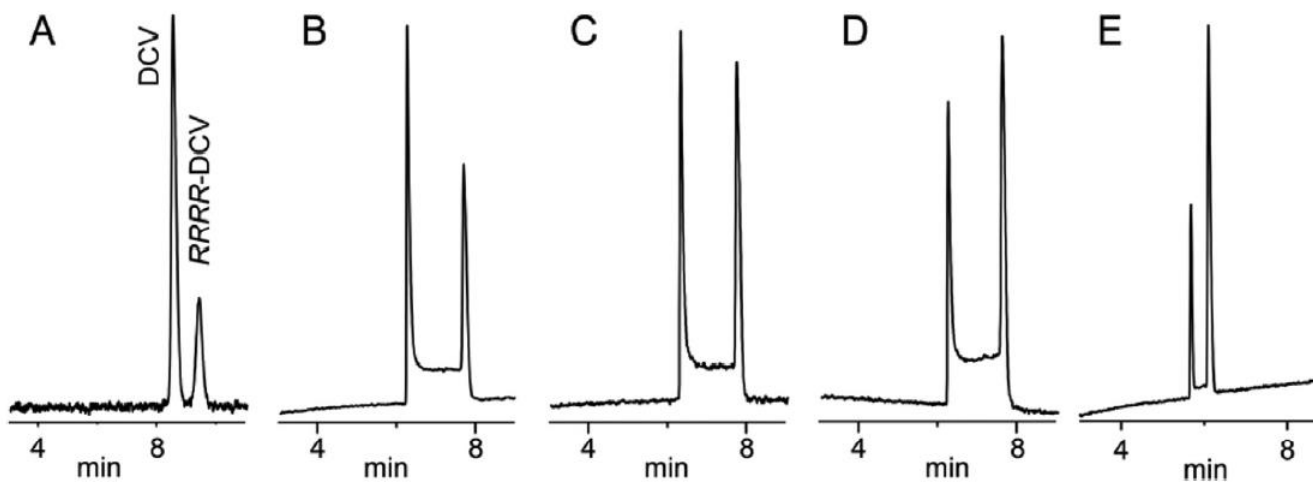
ციკლოდექსტრინი	კონცენტრაცია	დაყოფის ფაქტორი	მიგრაციის რიგი	კომენტარი
α -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.000	-	-
M- α -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.000	-	-
HP- α -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.000	-	-
CM- α -CD	5 mM	1.013	RRRR ^b > DCV	ნაწილობრივი დაყოფა
	20 mM	1.049	RRRR > DCV	ნაწილობრივი დაყოფა
S- α -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.000	-	-
β -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.000	-	-
M- β -CD	5 mM	1.070	DCV > RRRR	ფუძისეული დაყოფა
	20 mM	1.053	DCV > RRRR	ფუძისეული დაყოფა
HP- β -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.036	DCV > RRRR	ნაწილობრივი დაყოფა
CM- β -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.000	-	-
S- β -CD	5 mM	-	-	პიკებს შორის პლატო
	20 mM	-	-	პიკებს შორის პლატო
γ -CD	5 mM	-	-	პიკებს შორის პლატო
	20 mM	-	-	პიკებს შორის პლატო
M- γ -CD	5 mM	1.000	-	განიერი
	20 mM	1.000	-	-
HP- γ -CD	5 mM	1.000	-	-
	20 mM	1.000	-	-
CM- γ -CD	5 mM	1.080	DCV > RRRR	ფუძისეული დაყოფა
	20 mM	1.066	DCV > RRRR	ფუძისეული დაყოფა
S- γ -CD	5 mM	1.038	DCV > RRRR	ფუძისეული დაყოფა
	20 mM	1.060	DCV > RRRR	ფუძისეული დაყოფა

ნახ. 11 DCV და RRRR დაკლასავირის ნარევის სკრინინგის შედეგები.

ცხრილში ნაჩვენებია დაკლასავირის და RRRR დაკლასავირის ნარევის სკრინინგის შედეგები.

ანალიზის პირობები: 50 მილიმოლური ფოსფატური ბუფერი pH 2,5; ციკლოდექსტრინების კონცენტრაციებია 5 და 20 მილიმოლური.

ნაწილობრივი ენენტიომერული დაყოფა დაფიქსირდა კარბოქსი მეთილ α -ციკლოდექსტრინის და 2-ჰიდროქსიპროპილ- β -ციკლოდექსტრინის გამოყენების შემთხვევაში, ხოლო ფუძისეულ დაყოფას შესაძლოა მივაკუთვნოთ მეთილირებულ β -ციკლოდექსტრინის, კარბოქსიმეთილ γ -ციკლოდექსტრინის და სულფატირებული γ -ციკლოდექსტრინის შედეგები. საყურადღებოა, სულფატირებული β -ციკლოდექსტრინი და γ -ციკლოდექსტრინი, სადაც დაფიქსირდა ორი პიკი პლატოთი.



სურ. 12 წარმოდგენილი ელექტროფეროგრამები ასახავს დაკლასავირის და მისი ენენტიომერის არარაცემული ნარევის ანალიზს სხვადასხვა ციკლოდექსტრინების თანაობით:

A-დაკლასავირის და RRRR დაკლასავირის არაცემული ნარევი, აქირალურ ბუფერში 7მგ/მლ მეთილირებული β -ციკლოდექსტრინის თანაობისას.

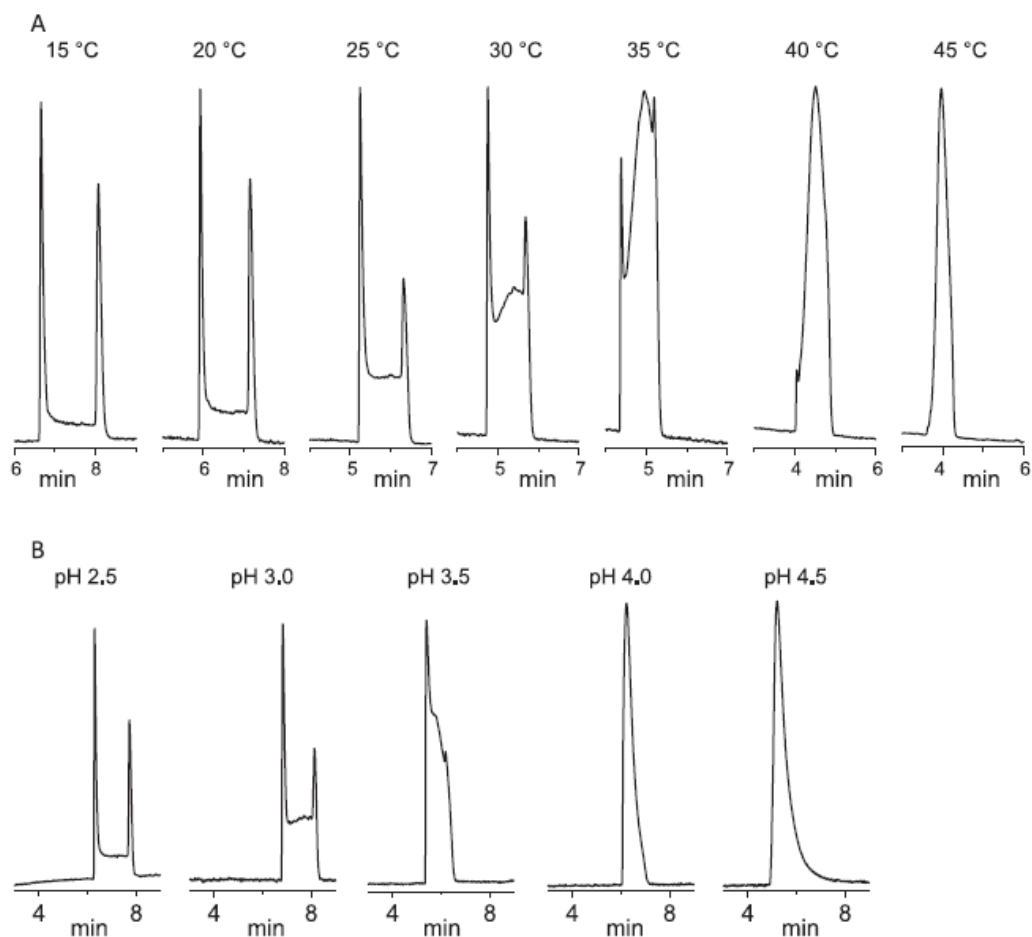
B --დაკლასავირის და RRRR დაკლასავირის არაცემული ნარევი , აქირალურ ბუფერში 20 მილიმოლური γ -ციკლოდექსტრინის თანაობისას.

C- დაკლასავირი და აქირალურ ბუფერში 20 მილიმოლური γ -ციკლოდექსტრინის თანაობისას.

D -- RRRR დაკლასავირი, აქირალურ ბუფერში 20 მილიმოლური γ -ციკლოდექსტრინის თანაობისას.

E- ნიმუში, რომელიც შეიცავს დაკლასავირს და γ ციკლოდექსტრინს გაანალიზებულია, ციკლოდექსტრინისგან თავისუფალ აქირალურ ბუფერში.

A და B ელექტროფეროგრამები ასახავს ფუძისეულ დაყოფას და პლატოს ფენომენს. უფრო მეტიც, C და D ელექტროფეროგრამებზე ნაჩვენებია ორი პიკი პლატოთი, სადაც დაკლასვირის და მისი ენანტიომერის RRRR-დაკლასვირის ანალიზი ჩატარდა γ ციკლოდექსტრინის თანაობისას. როგორც უკვე აღვნიშნეთ პლატოს ფენომენი მიუთითებს წონასწორობაზე, რომელიც ნელი პროცესია კაპილარული ელექტროფორეზის დროს და არ უკავშირდება ენანტიომერულ დაყოფას. როგოც წესი, კაპილარულ ელექტროფორეზში კომპლექსური ანალიზების დროს, კომპლექსური წონასწორობა ციკლოდექსტრინსა და ნიმუშს შორის ძალიან სწრაფია და თანაც ისე, რომ პიკის დაყოფა თავისუფალი და კომპლექსური ანალიზებისთვის არ ფიქსირდება, ამიტომ ჩატარდა შემდგომი ექსპერიმენტები, პლატოს ფენომენის შესასწავლად.



ნახ. 13 გამოსახული ელექტროფეროგრამებით წარმოდგენილია ტემპერატურის (A) და pH-ის (B) ცვლილების ეფექტები. აქირალურ გარემოში 20მილიმოლური მეთილირებულ β -ციკლოდექსტრინის თანაობისას

სურათის A - ნაწილში ელექტროფეროგრამებზე გამოსახულია კაპილარის ტემპერატურის ცვლილება 15° დან 45° C-მდე. შედეგმა აჩვენა, კაპილარში წონასწორული ქცევის დინამიკა, მიღებულია ორი პიკი კარგი დაყოფით, რომელიც ტემპერატურის ნელმატებასთან ერთად ნელი მიმოცვლის რეჟიმში ერთიანდება. როგორც ელექტროფეროგრამიდან ჩანს პიკებს შორის პლატო 20° C დან 35° C- მდე ცვლილების დროს უფრო მკაფიო გახდა ხოლო 45° C-ზე შეერთდა. რაც შეეხება pH-ს, ანალიზი ჩატარდა 2,5 დან 4,5 -მდე აქირალურ გარემოში pH - ის ცვლილების პირობებში, სადაც პიკების შეერთება დაფიქსირდა pH 4 ზე.

როგორც უკვე განვიხილეთ დაკლასტავირი შეიცავს იმიდაზოლის ორ ძირითად აზოტის ატომთან დაკავშირებულ პროტონს pK - ს მნიშვნელობით 5,6 და 4,9. ამრიგად როგორც იმიდაზოლის აზოტის ორივე ატომის პროტონაცია, კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტში, პლატოს ნელი წონასწორობის წინაპირობას წარმოადგენს. [1]

2.11. იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრული მეთოდი

იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრია წარმოადგენს ერთ-ერთ ყველაზე საინტერესო მეთოდს, რომლის გამოყენებითაც შეგვიძლია შევისწავლოთ ციკლოდექსტრინების სხვადასხვა პრეპარატებთან ურთიერთქმედების მექანიზმები. ეს მეთოდი ემყარება მოლეკულურ დონეზე მიმდინარე პროცესების დროს გამოყოფილი ან შთანთქმული სითბოს გაზომვას. იზოთერმული ტიტრაციის მეთოდი გამოიყენება როგორც ქიმიური ნივთიერებების, ასევე უჯრედული ბიოლოგიური მასალების ანალიზისთვის. სწორედ ეს მეთოდი გამოიყენება კომპლექსური პოლიელექტროლიტების დასახასიათებლად, ადსორბციის, მიცელარული სისტემების, ნუკლეინის მჟავების ურთიერთქმედების და სხვათა დასახასიათებლად. [16]

ძალიან დიდი მნიშვნელობა აქვს შეკავშირების მუდმივების და თერმოდინამიკური მახასიათებლების ცოდნას, რაც მოლეკულათა განსხვავებული ქცევის დადგენაში გვეხმარება. ამ მახასიათებლებზე ინფორმაციის მიღება შესაძლებელია სხვა ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდების გამოყენებითაც. მაგალითად, როგორცაა ქრომატოგრაფიული, კაპილარული ელექტროფორეზის, ასევე ბირთვულ მაგნიტური რეზონანსი, წრიული დიქროიზმის და სხვა. თუმცა იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრის უპირატესობას წარმოადგენს ის, რომ ამ მეთოდში თერმოდინამიკური მახასიათებლები პირდაპირ

იზომება, მაშინ როდესაც სხვა მეთოდების საშუალებით ხდება ამ სიდიდეების არაპირდაპირი გზით დადგენა.

იზოთერმული ტიტრაციის მეთოდი არის ყველაზე მგრძობიარე მეთოდი, რომელიც საშუალებას გვაძლევს პირდაპირი გზით დავადგინოთ: ურთიერთქმედების სტექიომეტრია (N), ასოციაციის მუდმივა (K), ენთალპიის ცვლილება (ΔH), ენტროპიის ცვლილება (ΔS) და გიბსის თავისუფალი ენერჯია (ΔG). მაშასადამე იზოთერმული ტიტრაციის მეთოდი წარმოადგენს თერმოდინამიკური პარამეტრების პირდაპირი განსაზღვრის მეთოდს. საბოლოო შედეგს ვიგებთ გატიტრის მრუდის საშუალებით, ამასთან ადეკვატური შედეგის მისაღებად მნიშვნელოვან ეტაპს წარმოადგენს გატიტრის მრუდის სწორად დამუშავება.

ჩვენი ექსპერიმენტის კვლევის საგანს წარმოადგენს ციკლოდექსტრინი-დაკლატასვირის ურთიერთქმედების შესწავლა იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრიული მეთოდით.

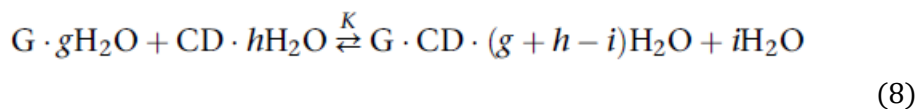
2.12. ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის ურთიერთქმედების თერმოდინამიკური პარამეტრები

ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის ურთიერთქმედების მექანიზმის დასახსიათებლად გამოიყენება თერმოდინამიკური პარამეტრები. როგორც წესი, კომპლექსწარმოქმნის პროცესი მიმდინარეობს სხვადასხვა ძალების მონაწილეობით, მაგალითად, ვან დერ ვალსის ან ჰიდროფობური მექანიზმით. ხოლო თერმოდინამიკური პარამეტრების მიხედვით შესაძლებელია კომპლექსწარმოქმნის მექანიზმის დადგენა.

კომპლექსის ფორმირების სხვადასხვა მექანიზმების თერმოდინამიკური ცვლილებები, როგორც ვარაუდობდნენ დაკავშირებული იყო წყლის ეფექტთან. ნაკლებად პოლარული ციკლოდექსტრინის ღრუ შევსებულია წყლის მოლეკულებით, ხოლო ჰიდროფობური მოლეკულა, რომელსაც შეუძლია ციკლოდექსტრინის ღრუსთან ურთიერთქმედება, თანდათანობით გამოაძევეს ღრუში არსებულ წყლის მოლეკულებს რის შედეგადაც წარმოიქმნება დაბალი ენერჯიის მქონე სტაბილური კომპლექსები. წყლის მოლეკულების გამოძევის პროცესი ასეთი ტიპის ჩანაცვლებისას მიმდინარეობს თანდათანობით. თავდაპირველად ჩანაცვლება ციკლოდექსტრინის ღრუში არსებული

წყლის ნაწილი და ლიგანდთან ერთად დარჩება წყლის გარკვეული რაოდენობა, ხოლო ციკლოდექსტრინის ღრუდან წყალი თავისუფალი სახით გამოძევდება. წყლის საწყისი მოლეკულების გათვალისწინებით, ზოგიერთი ციკლოდექსტრინები ხასიათდებიან 1:1 ტიპის კომპლექსებით. [16]

წყლიან ფაზაში ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის კომპლექსწარმოქმნის რეაქციას შემდეგი სახე აქვს:



სადაც G წარმოადგენს წყლის მოლეკულების რაოდენობას, რომლებიც ურთიერთქმედებენ თავისუფალ ლიგანდთან, h-არის ციკლოდექსტრინის ღრუში არსებული წყლის მოლეკულების რაოდენობა, ხოლო i არის კომპლექსწარმოქმნის პროცესში თავისუფალი სახით გამოყოფილი წყალი. მიუხედავად იმისა, რომ გამოთავისუფლებული წყლის მოლეკულების რაოდენობრივი შეფასება რთულია, ბოლო დროს ჩატარებული კვლევებით შეაფასეს 15-25_მდე წყლის მოლეკულა, რომელიც გამოიყოფა, მაგალითად ადამანტანის და β- ციკლოდექსტრინის ურთიერთქმედების შედეგად [16].

თერმოდინამიკური თვისებები დამოკიდებულია ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის კომპლექსწარმოქმნის უნარზე. ენთალპია ΔH გვიჩვენებს იზოთერმული ტიტრაციის ანალიზის დროს ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის ურთიერთქმედების შედეგად გამოყოფილი ან შთანთქმული სითბოს რაოდენობას. მაღალი დადებითი ΔS -ის ცვლილება, როგორც წესი გვიჩვენებს ციკლოდექსტრინის მნიშვნელოვან კომფორმაციულ თავისებურებებს ციკლოდექსტრინი-ლიგანდი კომპლექსწარმოქმნის პროცესში.

ენტროპიის გამოთვლა შესაძლებელია K და ΔH - ის მნიშვნელობებით, რომელსაც ვიღებთ იზოთერმული ტიტრაციის ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული ტიტრაციის მრუდის შესაბამისად.

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (9)$$

როგორც აღვნიშნეთ კომპლექსწარმოქმნის პროცესი წარიმართება ვან დერ ვაალსის და ჰიდროფობური ურთიერთქმედებით.

ენტალპიის და ენტროპიის ცვლილების განსაზღვრით შეგვიძლია დავადგინოთ, ამ ორი ტიპის ძალებიდან თუ რა ტიპის არაკოვალენტური ძალები მონაწილეობს ციკლოდექსტრინი-ლიგანდი კომპლექსწარმოქმნაში.

ვან დერ ვაალსის ურთიერთქმედება, როგორც წესი, ენთალპიურ კონტროლს ექვემდებარება და ენტროპიული წვლილი ამ ტიპის ურთიერთქმედებაში მინიმალური ან საერთოდ უარყოფითია .

$$\Delta H > T\Delta S \quad (10)$$

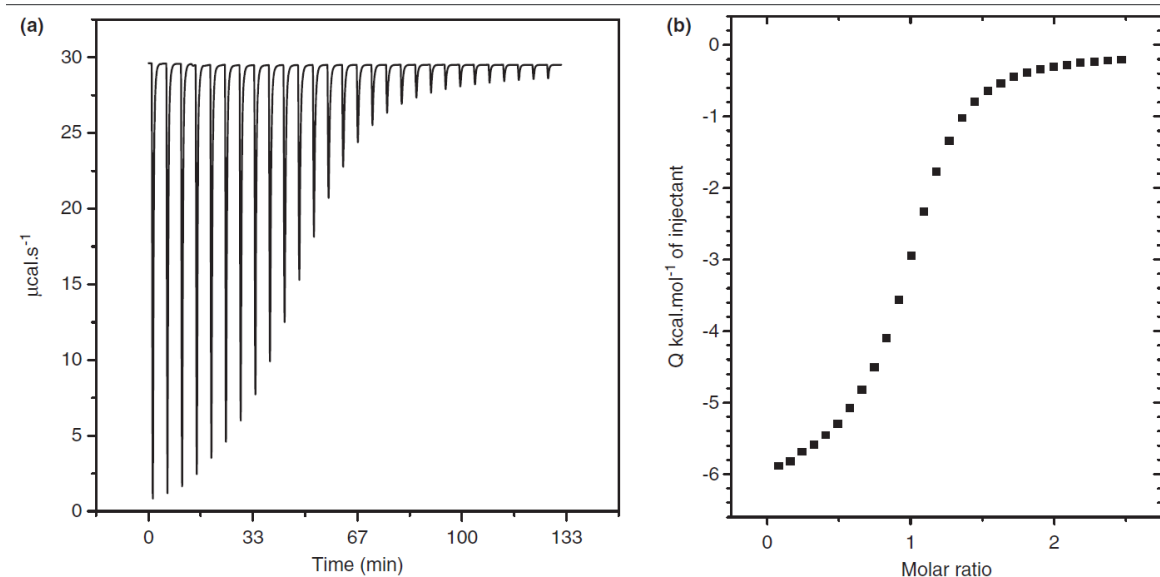
მეორეს მხრივ, ჰიდროფობური ურთიერთქმედების დროს დომინანტურია ენტროპიული წევრის როლი.

$$\Delta H < T\Delta S \quad (11)$$

აღსანიშნავია, რომ კომპლექსწარმოქმნაზე დიდ გავლენას ახდენს ტემპერატურა. ტემპერატურის ცვლილება გავლენას ახდენს ენთალპიის და ენტროპიის მნიშვნელობებზე. ტემპერატურის შეცვლის დროს იცვლება გიბსის თავისუფალი ენერჯის მნიშვნელობაც. მაშასადამე ტემპერატურის შეცვლით შესაძლებელია გიბსის ენერჯის ვარიაცია, რაც დაკავშირებულია ენთალპიურ-ენტროპიულ კომპენსაციასთან [7]. ამ ეფექტის მიხედვით შეგვიძლია იმ სითბოტევადობის განსაზღვრა, რომელიც განპირობებულია ლიგანდის მიერ ციკლოდექსტრინის ღრუდან წყლის გამოძევებით. სითბოტევადობა ΔC_p გამოითვლება შემდეგი ფორმულით (იმ დაშვებით, რომ ამ ტემპერატურულ ინტერვალში ხვედრითი სითბოტევადობა არ არის დამოკიდებული ტემპერატურაზე):

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad (12)$$

ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის შეკავშირების დასახასიათებლად ვიყენებთ სხვადასხვა ტიპის მრუდებს. როდესაც ლიგანის ხსნარს ემატება ციკლოდექსტრინის ხსნარი, ორი მოლეკულის ურთიერთქმედებით გამოყოფილი სითბო პირდაპირპროპორციულია ხსნარში დამატებული ციკლოდექსტრინის რაოდენობისა. რაც უფრო გაჯერებულია ციკლოდექსტრინი-ლიგანდის სისტემა მით უფრო მცირდება სითბოს სიგნალი. (a)



ნახ. 14 იზოთერმული ტიტრაციის ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული მრუდები.

სიტბოს ინტეგრირების შემდეგ, როგორც ორი რეაგენტს შორის მოლეკული თანაფარდობის ფუნქცია, ტიტრაციის მრუდი უნდა დაკორექტირდეს განზავების და პროტონაციის შესაძლო ეფექტებისთვის. უკვე დამუშავებული ინტეგრაციის მრუდის მიხედვით (b) ისაზღვრება ურთიერთქმედების ასოციაციის მუდმივა, სტექიომეტრია და თერმოდინამიკური პროფილები. თუ მრუდი არასწორად იქნება დამუშავებული, მივიღებთ თერმოდინამიკური პარამეტრების და K შეუსაბამო მნიშვნელობებს.

მარტივი სახით ციკლოდექსტინის ლიგანდთან ურთიერთქმედებისას 1:1 სტექიომეტრიის დროს შეიძლება ასეთი სახით ჩავწეროთ:



შეკავშირების მუდმივა ჩაიწერება შემდეგი განტოლების სახით:

$$K = \frac{[G \cdot CD]}{[G][CD]} \quad (14)$$

სადაც $[CD]$, $[G]$ და $[G \cdot CD]$ გამოსახავს ციკლოდექსტინის, ლიგანდის და მათი კომპლექსის შესაბამის კონცენტრაციებს.

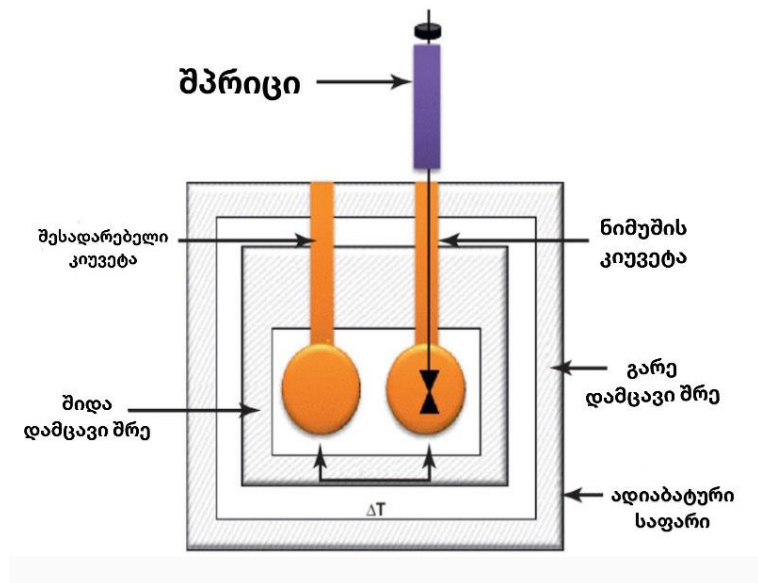
წონასწორულ მდგომარეობაში გიბსის თავისუფალი ენერგია წარმოქმნილი კომპლექსისთვის $[G \cdot CD]$ გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (15)$$

სადაც R არის აირის მუდმივა, T აბსოლუტური ტემპერატურა კელვინებში.

2.13. იზოთერმული ტიტრაციის კალორიმეტრის ხელსაწყო

იზოთერმული ტიტრირების კალორიმეტრს აქვს ორი კიუვეტა. ერთი მათგანი წარმოადგენს შესადარებელს და მასში ძირითადად მოთავსებულია წყალი, ხოლო მეორეში საკვლევი ნიმუში. ხელსაწყოს აქვს შპრიცი რომელშიც შეგვყავს ციკლოდექსტრინი გახსნილი ბუფერულ ხსნარში და მისი საშუალებით იტიტრება საკვლევი ნივთიერება, ხოლო გატიტრის დროს ბუფერის ყოველი ახალი ულუფის დამატებისას ხდება სითბოს შთანთქმა ან გამოყოფა. აღსანიშნავია რომ ბუფერის და ნიმუშის განთავსების თანმიმდევრობა არ არის მკაცრად განსაზღვრული და შესაძლებელია შებრუნებული გატიტრვა, ე.ი. როდესაც შპრიცში შევიყვანთ საკვლევ ნივთიერებას, ხოლო კიუვეტაში ციკლოდექსტრინის ბუფერულ ხსნარს. [16]



ნახ. 15 იზოთერმული მიკროკალორიმეტრის ხელსაწყოს სქემა.

ხელსაწყო შედგება შემდეგი ნაწილებისგან:

1. ორი კიუვეტა
2. შპრიცი
3. სენსორი

4. თერმოსტატი, რომელიც უზრუნველყოფს კიუვეტებში ტემპერატურის შენარჩუნებას.
5. ჩამწერი მოწყობილობა.

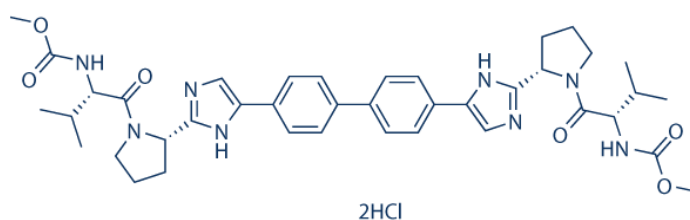


ნახ. 16. იზოთერმული მიკროკალორიმეტრის ხელსაწყო.
VP-ITC Calorimeter.

3. იზოთერმული ტიტრაციის ექსპერიმენტი

3.1. ექსპერიმენტში გამოყენებული ნივთიერებები

დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდი $C_{40}H_{52}Cl_2N_8O_6$



ნახ. 17. DVC-მოლეკულური და სტრუქტურული ფორმულა

აქირალურ ბუფერად გამოვიყენეთ 50 მილიმოლური კალიუმის დიჰიდროფოსფატის ხსნარი, ხოლო ქირალურ სელექტორებად შემდეგი ციკლოდექსტრინები:

- β-ციკლოდექსტრინი
- γ-ციკლოდექსტრინი

- დი-მეთილ ბეტა ციკლოდექსტრინი _____ ჰეპტაკის (2,6-დი-*O*-მეთილ)- β -CD
- ტრი-მეთილ ბეტა ციკლოდექსტრინი _____ ჰეპტაკის (2,3,6-ტრი-*O*-მეთილ)- β -CD

3.2. ექსპერიმენტის პირობები :

ბუფერად გამოვიყენეთ 50 მილიმოლური ფოსფატური ბუფერი pH-2.5 .

ციკლოდექსტრინები:

- β -ციკლოდექსტრინი და მისი ნაწარმები
- γ - ციკლოდექსტრინი

ანალიზის პროცესში გამოვიყენეთ სხვადასხვა მოლური კონცენტრაციის მქონე ხსნარები. უნდა აღინიშნოს რომ მიკროკალორიმეტრულ ექსპერიმენტის მნიშვნელოვან ნაწილს წარმოადგენს საკვლევი ნივთიერების და ბუფერის ოპტიმალური მოლური კონცენტრაციების შერჩევა.

მოლური კონცენტრაციები დაკლატასვირის და β -ციკლოდექსტრინთან ექსპერიმენტის დროს:

DCV-0.5 მილიმოლური

β -CD 15 მილიმოლური

თითოეული მათგანი გავხსენით 50 მილიმოლურ ფოსფატურ ბუფერში pH 2.5

ხოლო დაკლატასვირის და γ - ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში ოპტიმალური მოლური კონცენტრაციებია:

DCV- 2 მილიმოლური

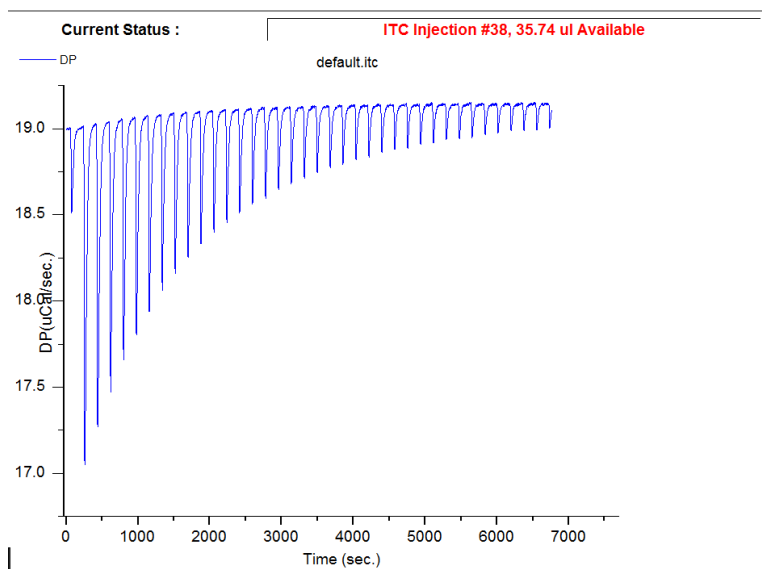
γ -CD-20 მილიმოლური

მიკროკალორიმეტრის ექსპერიმენტი შესაძლოა ვაწარმოთ, როგორც პირდაპირი გატიტვრით ასევე უკუგატიტვრით. ორივე შემთხვევაში მნიშვნელოვანია სწორად განვსაზღვროთ, შპრიციდან დამატებული ნივთიერების მოცულობა და უშუალოდ გატიტვრებს შორის ინტერვალი.

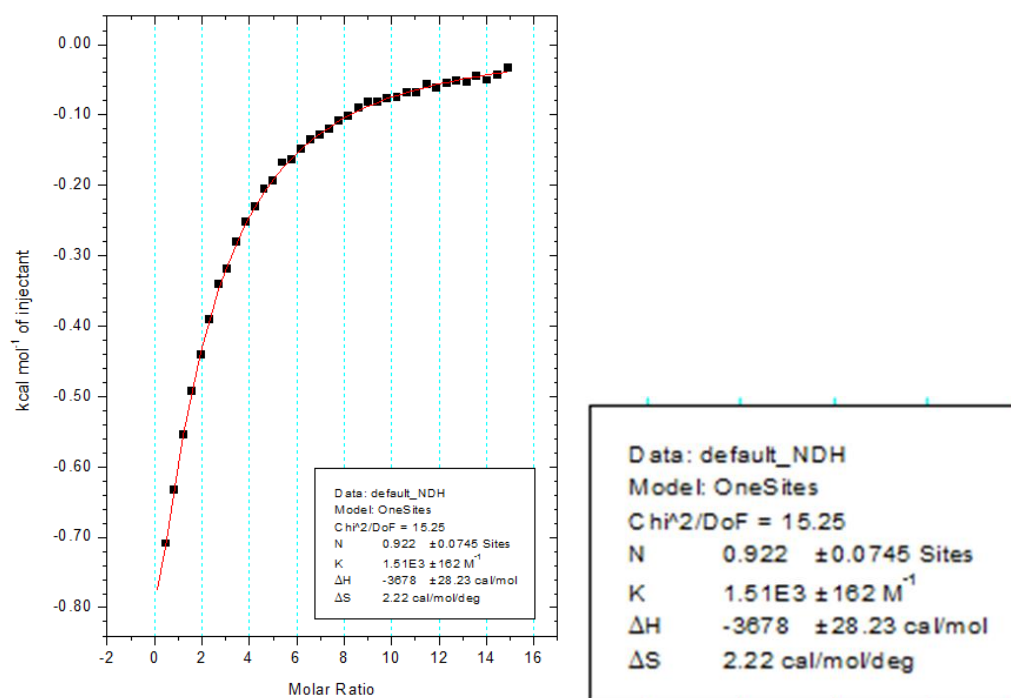
მეთოდის დამუშავების დროს ასევე მნიშვნელოვანია ტემპერატურის სწორად შერჩევა.

4. ექსპერიმენტით მიღებული შედეგების განსჯა

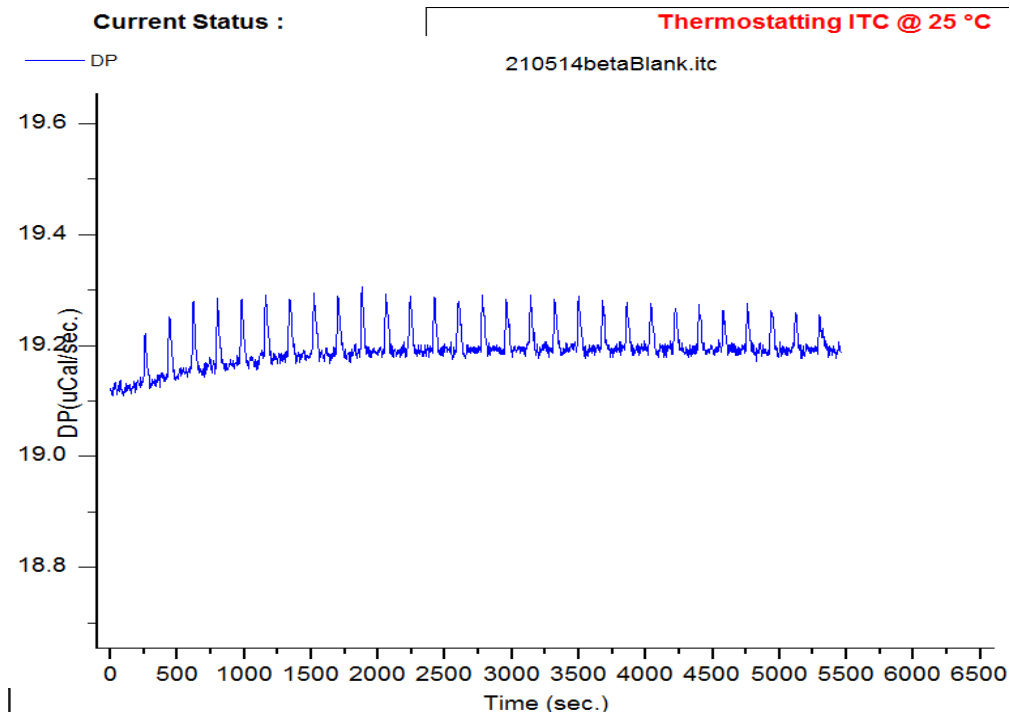
4.1 0.2 მილიმოლური DCV და β -CD



ნახ.18. 0.2 მილიმოლური დაკლასავირის გატიტვრა ბეტა ციკლოდექსტრინით.



ნახ. 19. ინტეგრაციის მრუდი. 0.2 მილიმოლური დაკლასავირის გატიტვრა ბეტა ციკლოდექსტრინით.



ნახ. 20. საკონტროლო გატიტვრა.კალიუმის დიჰიდროფოსფატის გატიტვრა ბეტა-ციკლოდექსტრინით.

გამოყენებულია 0.2 მილიმოლური დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდი, 15 მილიმოლური β-ციკლოდექსტრინი, ფოსფატური ბუფერი 50 მილიმოლური *pH* 2.5 ინიცირება 7 მიკროლიტრი, დაყოვნების დრო 180 წამი. ტემპერატურა 25°C

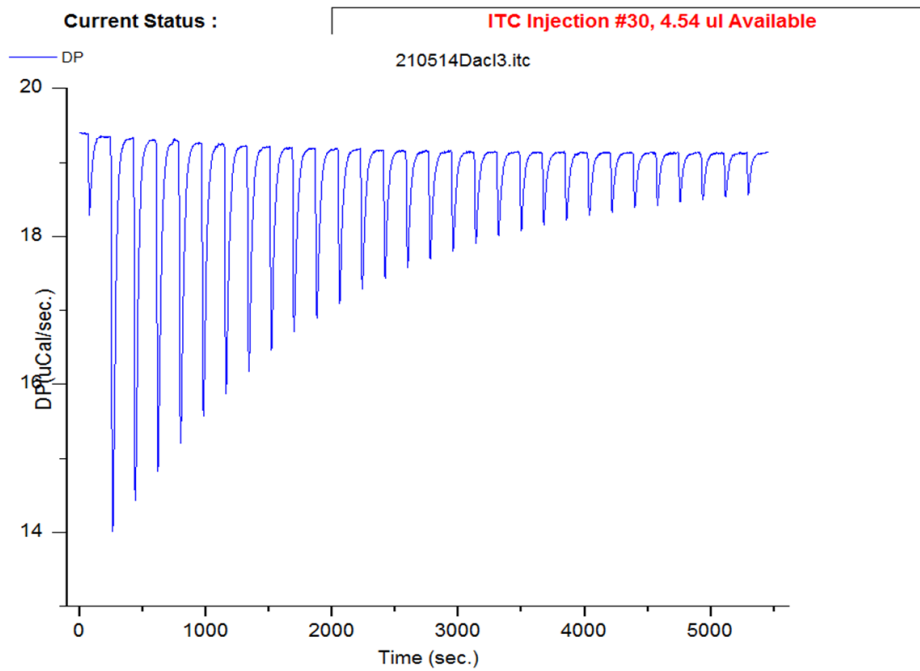
დაკლასვირის და ბეტა ციკლოდექსტრინის ურთიერთქმედებისას 25°C _ზე მივიღეთ შემდეგი შედეგები: შეკავშირების მუდმივა $K = 1.51 \times 10^3 \pm 162 M^{-1}$

შეკავშირების მუდმივას საკმაოდ მაღალი მნიშვნელობა მიუთითებს შესაბამის პირობებში წარმოქმნილი კომპლექსის მდგრადობაზე.

ენტალპია $\Delta H = -3678 \pm 28.23 \text{ cal/mol}$

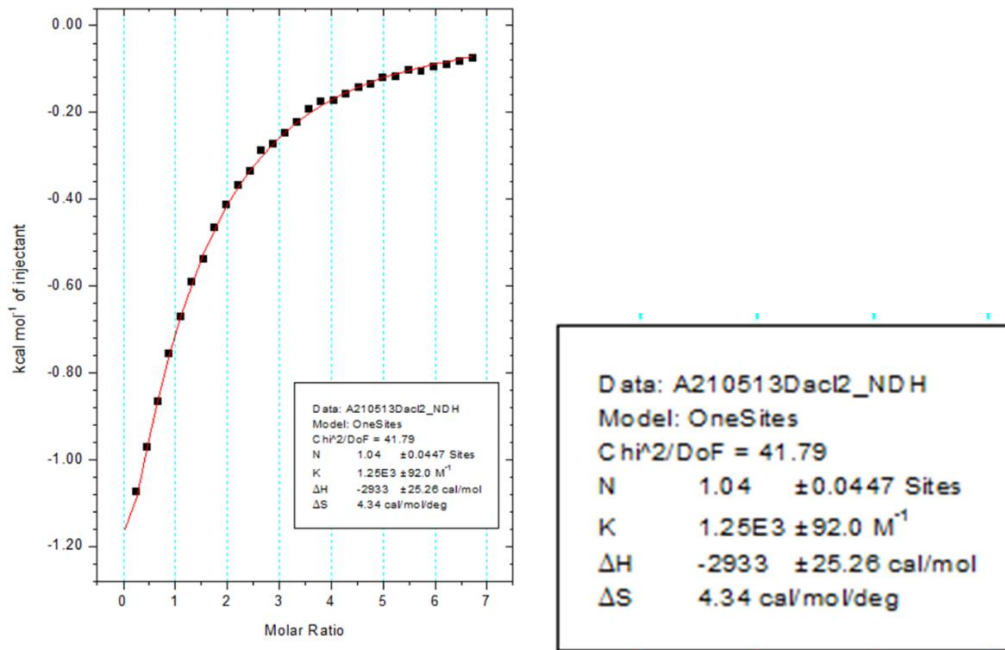
ენტროპია $\Delta S = 2.22 \text{ cal/mol/deg}$

4.2 0.5 მილიმოლური DCV და β -CD



ნახ. 21 - 0.5 მილიმოლური დაკლატასვირის გატიტვრა ბეტა ციკლოდექსტრინით.

გამოყენებულია 0.5 მილიმოლური დაკლატასვირის დიჰიდროქლორიდი, 15 მილიმოლური β -ციკლოდექსტრინი, ფოსფატური ბუფერი 50 მილიმოლური pH 2.5 ინიცირება 10 მიკროლიტრი, დაყოვნების დრო 180 წამი. ტემპერატურა 25°C



ნახ.22 ინტეგრაციის მრუდი. 0.5 მილიმოლურიდაკლასვირის გატიტვრა ბეტა ციკლოდექსტრინით.

დაკლასვირის და ბეტა ციკლოდექსტრინის ურთიერთქმედებისას 25°C _ზე მივიღეთ შემდეგი შედეგები: შეკავშირების მუდმივა $K = 1.25 \times 10^3 \pm 92.0 M^{-1}$

შეკავშირების მუდმივას მაღალი მნიშვნელობა მიუთითებს შესაბამის პირობებში წარმოქმნილი კომპლექსის მდგრადობაზე.

ენტალპია $\Delta H = -2933 \pm 25.26 \text{ cal/mol}$

ენტროპია $\Delta S = 4.34 \text{ cal/mol/deg}$

ჩვენი უმთავრესი მიზანი იყო ოპტიმალური თერმოდინამიკური პარამეტრების დადგენა. ასევე უნდა დაგვედგინა თუ რა ოპტიმალურ კონცენტრაციაზე და ტემპერატურაზე მიიღწევა ყველაზე მდგრადი კომპლექსი ბეტა და გამა ციკლოდექსტრინებს და დაკლასვირს შორის.

ანალიზის ორივე შედეგიდან ჩანს, რომ დაკლასვირის და ბეტა ციკლოდექსტრინის ურთიერთქმედების პროცესი არის ეგზოთერმული, მაშინ როცა მხოლოდ ბეტა ციკლოდექსტრინის ბუფერთან ურთიერთქმედების შედეგად მივიღეთ ენდოთერმული პროცესი.

ერთი შეხედვით ენტროპიის დადებითი მნიშვნელობა, მიუთითებს კომპლექსწარმოქმნის ჰიდროფობური ძალებით მიმდინარეობაზე.

თუმცა, ზუსტი შეფასებისთვის საჭიროა დავადგინოთ ენთალპიური წვლილი უფრო მეტია ამ პროცესის წარმოქმნაში თუ ენტროპიული. ამისათვის ენტროპიული მნიშვნელობა უნდა გავამრავლოთ ექსპერიმენტის ტემპერატურაზე კელვინებში და შევადაროთ ენთალპიის მიღებულ შედეგს.

0.2 მილიმოლური დაკლათასვირის დიჰიდროქლორიდის და 15 მილიმოლური β-ციკლოდექსტრინის ანალიზით, 25°C – ზე მიღებული შედეგების მიხედვით:

1. ენტროპიისთვის

$$2.22 \times 298.15K = 661,9 \text{ კალ.}$$

0.5 მილიმოლური დაკლათასვირის დიჰიდროქლორიდის და 15 მილიმოლური β-ციკლოდექსტრინის ანალიზით, 25°C – ზე მიღებული შედეგების მიხედვით:

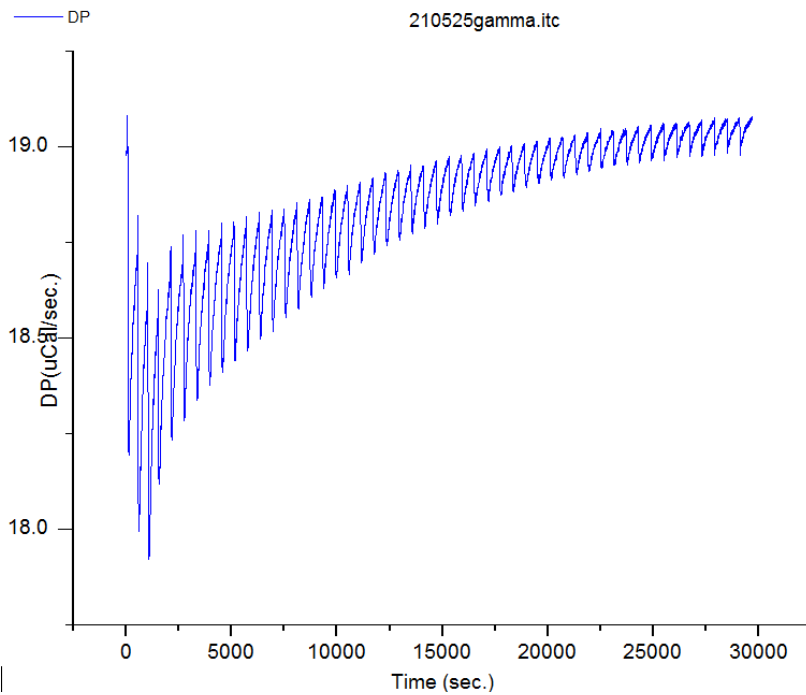
1. ენტროპიისთვის

$$4.34 \times 298.15K = 1294 \text{ კალ.}$$

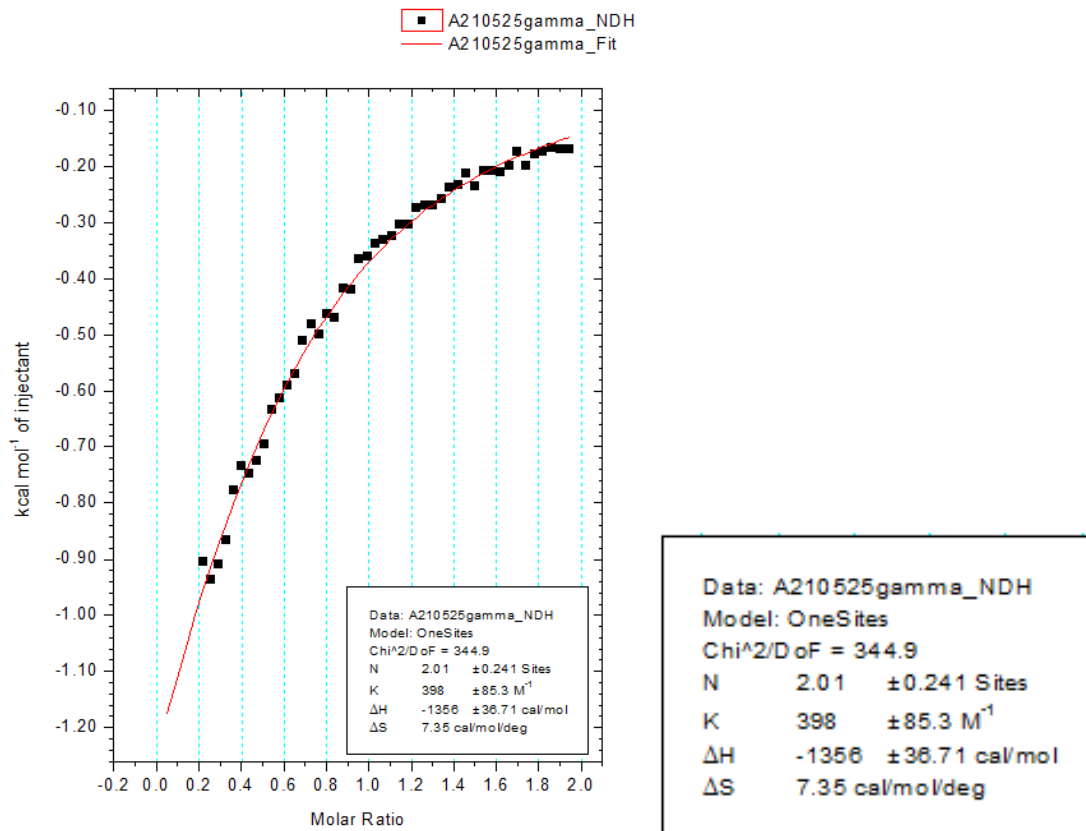
მიუხედავად იმისა, რომ გიბსის ენერგიაში ენტროპიას შეაქვს დადებითი წვლილი, გამოთვლებით მიღებული შედეგებით ცხადი გახდა, რომ ენთალპიური წვლილი უფრო მეტია, ვიდრე ენტროპიული, რაც ვან დერ ვალსის ტიპის ძალების დომინანტურ როლზე მიუთითებს.

დაკლათასვირის და β-ციკლოდექსტრინის შედეგიდან ჩანს, რომ კომპლექსი არის 1:1 სტექიომეტრიის.

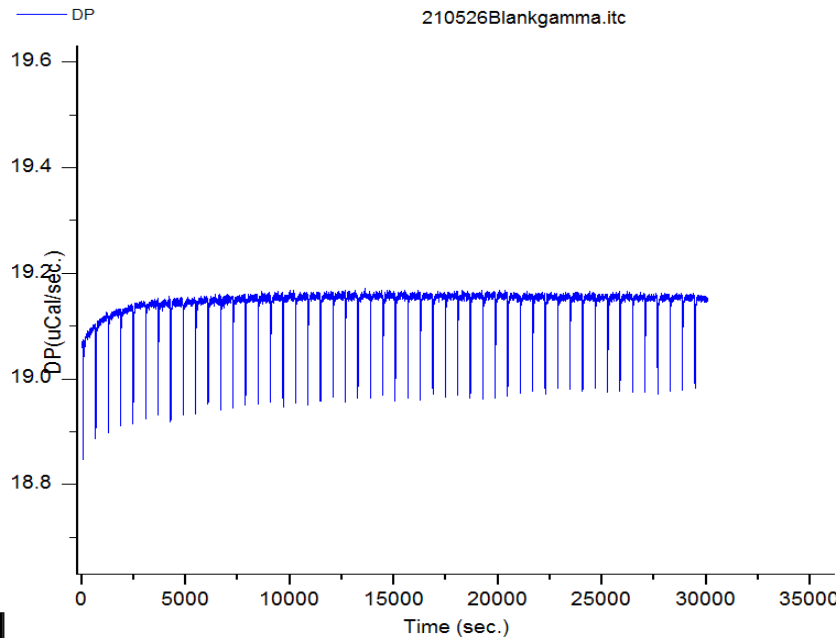
4.3 DCV და γ -CD



ნახ.23 დაკლასვირის გატიტვრა გამა ციკლოდექსტრინით.



ნახ.24 ინტეგრაციის მრუდი. დაკლასვირის გატიტვრა გამა ციკლოდექსტრინით.



ნახ.25 საკონტროლო გატიტვრა. კალიუმის დიჰიდროფოსფატის გატიტვრა გამა-ციკლოდექსტრინით.

გამოყენებულია 2 მილიმოლური დაკლასვირის დიჰიდროქლორიდი და 20 მილიმოლური γ -ციკლოდექსტრინი, ფოსფატური ბუფერი 50 მილიმოლური pH 2.5 ინიცირება 5 მიკროლიტრი, დაყოვნების დრო 600 წამი. ტემპერატურა $25^{\circ}C$

დაკლასვირსა და γ -ციკლოდექსტრინს შორის β -ციკლოდექსტრინისგან განსხვავებით წარმოიქმნება 2:1 სტექიომეტრიის მქონე შედარებით სუსტი კომპლექსი. N არის 2 ის ტოლი, რაც იმას ნიშნავს, რომ γ - ციკლოდექსტრინის ერთი მოლეკულა უკავშირდება დაკლასვირის ორ მოლეკულას, ეს ლოგიკურია γ - ციკლოდექსტრინის ზომების გათვალისწინებით.

$$\text{შეკავშირების მუდმივა } K = 398 \pm 85.3 M^{-1}$$

$$\text{ენტალპია } \Delta H = -1356 \pm 36.71 \text{ cal/mol}$$

$$\text{ენტროპია } \Delta S = 7.35 \text{ cal/mol/deg}$$

გამოთვლის მიხედვით:

$$1. \text{ ენტროპიისთვის}$$

$$7,35 \times 298.15K = 2191,4 \text{ კალ.}$$

შედეგიდან, ჩანს რომ კომპლექსის წარმოქმნას უპირატესად ხელს უწყობს ენტროპიული ეფექტი, რაც პროცესში ჰიდროფობური ძალების დომინატურ როლზე მიუთითებს, თუმცა კომპლექსწარმოქმნის პროცესში მნიშვნელოვანია ენთალპიის დადებითი წვლილიც.

5. დასკვნები

1. წინამდებარე ნაშრომში აღწერილი მიკროკალორიმეტრიული გამოკვლევები ჩატარდა იმ მიზნით, რომ შეგვესწავლა დაკლათასვირის ენანტიომერების კომპლექსწარმოქმნა β -ციკლოდექსტრინთან და γ -ციკლოდექსტრინთან.
2. მიკროკალორიმეტრიულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ დაკლათასვირისა და β -ციკლოდექსტრინის შორის წარმოიქმნება 1:1 სტექიომეტრიის მქონე საკმაოდ მტკიცე კომპლექსი ($K = 1510 \pm 162M^{-1}$). კომპლექსის წარმოქმნას უპირატესად ხელს უწყობს ენთალპიური ეფექტი ($\Delta H = -3678 \pm 28.23 \text{ cal/mol}$), რაც ვან დერ ვალსის ტიპის ძალების დომინანტურ როლზე მიუთითებს ამ პროცესში. მიუხედავად ენთალპიის ცვლილების დომინანტური როლისა, ენტროპიული წევრის დადებითი წვლილიც მნიშვნელოვანია ($\Delta S = 2.22 \text{ cal/mol/deg}$) კომპლექსწარმოქმნის პროცესში (რაც მიუთითებს ჰიდროფობური ურთიერთმოქმედების როლზე).
3. მიკროკალორიმეტრიულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ დაკლათასვირისა და γ -ციკლოდექსტრინის შორის, β -ციკლოდექსტრინისგან განსხვავებით წარმოიქმნება 2:1 სტექიომეტრიის მქონე შედარებით სუსტი კომპლექსი ($K = 398 \pm 85.3M^{-1}$). კომპლექსის წარმოქმნას, ასევე β -ციკლოდექსტრინისგან განსხვავებით, უპირატესად ხელს უწყობს ენტროპიული ეფექტი ($\Delta S = 7.35 \text{ cal/mol/deg}$), რაც ჰიდროფობური ძალების დომინანტურ როლზე მიუთითებს ამ პროცესში. მიუხედავად ენტროპიის ცვლილების დომინანტური როლისა, ენთალპიური წევრის დადებითი წვლილიც მნიშვნელოვანია ($\Delta H = -1356 \pm 36.71 \text{ cal/mol}$) კომპლექსწარმოქმნის პროცესში (რაც მიუთითებს ვანდერვალსის ტიპის ურთიერთმოქმედების როლზე).
4. ამგვარად მიკროკალორიმეტრულმა გამოკვლევებმა ცალსახად აჩვენა მნიშვნელოვანი განსხვავებები დაკლათასვირის კომპლექსებს შორის β -ციკლოდექსტრინთან და γ -ციკლოდექსტრინთან კომპლექსის სტექიომეტრის, სიმტკიცის და მის წარმოქმნაში მონაწილე არაკოვალენტური ძალების თვალსაზრისით. სამწუხაროდ, ეს განსხვავებები ჯერჯერობით არ იძლევა იმის საშუალებას, რომ ცალსახად ავსხნათ კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტში დამზერილი მნიშვნელოვანო განსხვავება ამ კომპლექსების დინამიკას შორის.

6. გამოყენებული ლიტერატურა

1. S. Krait, A. Salgado, C. Villani, L. Naumann, C. Neusüß, B. Chankvetadze, G.K.E. Scriba, Unusual complexation behavior between daclatasvir and γ -Cyclodextrin. A multiplatform study, J. Chromatogr. A, 1628 (2020) 461448 (14 pp). doi:10.1016/j.chroma.2020.461448.
2. [//www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614593/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614593/)
3. <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/chemical-processes/stereochemistry/a/chiral-drugs>
4. https://en.wikiversity.org/wiki/Capillary_Electrophoresis
5. B. Chankvetadze, Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, Wiley & Sons, Chichester-New York, 1997, 555 pp.
6. https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis
7. D. Heiger, High performance capillary electrophoresis, 2000(5968-9963E), Agilent
8. <https://www.clicktocurecancer.info/capillary-electrophoresis/conclusion-nak.html>
9. <https://notendur.hi.is/thorstlo/general.pdf>
10. G. Gubitz, M.G. Schmid, Chiral Separations: Methods and Protocols, Humana Press, Totawa, New Jersey, 2004
11. B. Chankvetadze, G. Blaschke, Enantioseparations in capillary electromigration techniques: Recent developments and future trends *,1 J. Chromatogr. A, 906 (2001) 309–363.
12. [Hepatitis C - Wikipedia](#)
13. [Daclatasvir dihydrochloride | DrugBank Online](#)
14. D.L. Cameroon, et al. Pressure perturbation calorimetry and the thermodynamics of noncovalent interactions in water: comparison of protein–protein, protein–ligand, and cyclodextrin–adamantane complexes. J. Phys. Chem. B 114 (2010) 16228–16235.

15. K Bouchemal, et al. (2009) A comprehensive study on the inclusion mechanism of benzophenone into supramolecular nanoassemblies prepared using two watersoluble associative polymers. *J. Therm. Anal. Calorim.* 98, 57–64
16. K. Bouchemal, S. Mazzaferro, How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions *Drug Discovery Today* 17 (2012) 623-629.
17. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions Kawthar Bouchemal and Silvia Mazzaferro. Universite ´ Paris-Sud, School of Pharmacy, UMR CNRS 8612, 5 rue J-B Cle ´ ment, 92296 Cha ´ tenay Malabry Cedex, France.
18. *Journal of Chromatography A*. Unusual complexation behavior between daclatasvir and γ -Cyclodextrin. A multiplatform study. Sulaiman Krait a , 1 , Antonio Salgado b , 1 , Claudio Villani c , Lukas Naumann d , Christian Neusüß d , Bezhan Chankvetadze e , Gerhard K.E. Scriba