

Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie – decembrie 2015

Etapa V 15. 12. 2015

Verificarea modelului teoretic prin masuratori de relaxare selectiva, RMN.

In sistemul circulator sangvin, medicamentele sunt transportate sub forma de complexi macromoleculari cu albumina serica umana. Albumina serica umana (HSA), cea mai abundenta proteina din plasma sangvina, are proprietatea unica de a lega in mod reversibil un numar impresionant de bioliganzi, in special in subdomeniile IIA si IIIA, cunoscute sub numele de pozitiiile Sudlow I si II. Mecanismul de legare precum si taria interactiunii medicament – HSA depinde in special de proprietatile fizice si chimice ale biomoleculei precum si de abilitatea de legare a albuminei. In cazul terapiilor de lunga durata, ca de exemplu in terapia cancerului, este necesara administrarea simultana a doua sau mai multe medicamente. In marea majoritate a cazurilor, co-administrarea a doua medicamente conduce la cresterea concentratiei in sange a medicamentului ce prezinta o afinitate mai scazuta fata de albumina serica umana, el fiind substituit in anumite pozitii de legare de medicamentul ce prezinta o afinitate mai mare fata de HSA. Deoarece distributia si timpul de viata a unui medicament in corpul uman depinde intre altele de taria legaturii medicament – HSA, o astfel de interactiune poate cauza o alterare a concentratiei fractiei libere de medicament si in consecinta sa produca efecte secundare. Exista si posibilitatea ca un medicament nou administrat sa se lege de HSA in pozitii diferite fata de primul, dar modificarile ce pot apare in structura albuminei serice umane sa conduca la o alterare a afinitatii HSA fata de primul medicament legat. Deci este posibila coexistenta a doua mecanisme de legare si anume: competitiv , respectiv necompetitiv.

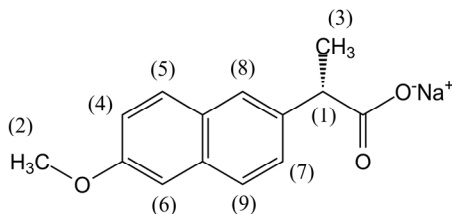
Albumina serica umana interactioneaza cu medicamentele prin pozitiiile de legare care inasa difera in afinitate fata de un medicament particular. Pozitiile de legare cu afinitate ridicata caracteristice unei interactiuni puternice intre medicament si HSA, sunt caracterizate printr-un schimb lent al medicamentului intre starea legata si cea libera si sunt nemasurabile prin RMN, dar pot fi studiate prin intermediul spectroscopiei de fluorescenta [1,2]. Cand moleculele de medicament sunt puternic legate in pozitiiile HSA cu afinitate ridicata, efectele largirii liniei de rezonanta face ca semnalul RMN al medicamentului sa devina neobservabil. Moleculele de medicament sunt legate in primul rand in pozitiiile primare de legatura iar apoi excesul de ligand este legat in pozitiiile secundare de legare. Tehnica RMN permite deci doar observarea interactiunilor cu afinitate scazuta in care moleculele de medicament aflate in stare libera sau legata sunt intr-un schimb rapid pe scara de timp RMN. Prin acest tip de interactiune o molecula de HSA poate lega mai multe molecule de medicament, dar interactiunea este foarte slaba. S-a observat experimental ca multe medicamente sunt implicate in acest tip de interactiune cu afinitate scazuta, in special cand concentratia de medicament este mult mai mare decat cea a albuminei serice umane. Astfel, variatia parametrilor NMR caracteristici protonilor medicamentului, precum deplasarea chimica, vitezele de relaxare nucleara (selectiva sau neselectiva), sau coeficientul de difuzie, functie de concentratia ligandului poate fi utilizata in vederea caracterizarii interactiunii ligandului cu HSA. Deoarece variatiile deplasarii chimice induse in urma procesului de legare sunt mici in comparatie cu modificarile vitezelor de relaxare, studiul efectuat s-a focalizat pe variatia vitezei de relaxare longitudinala selectiva ($R_{1,sel}$), functie de concentratia ligandului, pentru o concentratie constanta a albuminei serice umane. Se poate demonstra ca viteza de relaxare

selectiva a ligandului reprezinta un indicator mult mai sensibil pentru procesul de legare decat viteza neselectiva. Metoda bazata pe determinarea vitezei de relaxare longitudinala selectiva are avantajul unei dependente favorabile a acestei viteze de timpul de corelare in regiunea unor miscari moleculare lente caracteristice unei molecule mici aflate in interactiune cu o macromolecula. In cazul unui spectru ^1H RMN bine rezolvat, $R_{1,\text{sel}}$ se poate determina cu usurinta prin excitarea selectiva a unui singur proton, lasandu-i pe ceilalti neperturbati, si urmarind revenirea acestuia in timp la echilibru.

Materiale

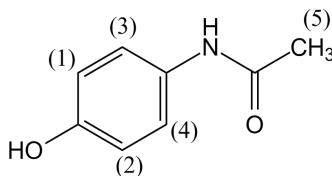
In vederea verificarii modelului teoretic de interactiune dintre albumina serica umana si o serie de biomolecule, am utilizat urmatoarele substante farmaceutice:

Naproxen (1), un agent anti-inflamator nesteroidian, utilizat in tratarea durerilor sau inflamatiilor provocate de artrite, anchiloze, spondiloze, tendinite sau guta.



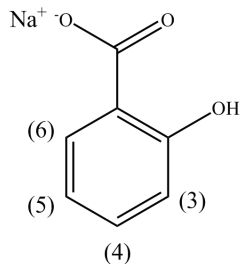
Naproxen

Paracetamol (2), un derivat de para-aminofenol avand o actiune analgezica si antipiretica. In general se administreaza in cazul durerilor de cap si a altor dureri minore. In combinatie cu analgezice opioide, se administreaza in cazul unor dureri severe precum cele post-operatorii sau a durerilor provocate de diverse tipuri de cancer.



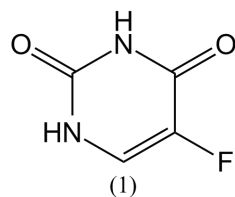
Paracetamol

Salicilat de Na (3) este sarea sodica a acidului salicilic. Se utilizeaza drept analgezic si antipiretic. Poate actiona si ca agent anti-inflamator nesteroidian inducand apoptoza in celulele canceroase precum si necroza acestora.



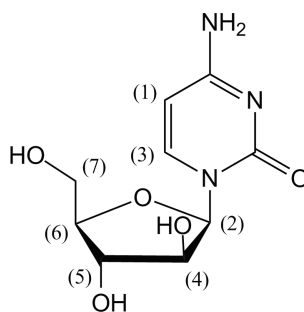
Salicilat de sodiu

Fluorouracil (4), un analog al pirimidinei utilizat in tratamentul cancerului. Fluorouracilul este un inhibitor suicidal si actioneaza prin inhibarea ireversibila a timidilat - sintazei. El apartine familiei de medicamente cunoscute sub numele de antimetaboliti. Prezenta antimetabolitilor in organism are efecte toxice asupra celulelor, oprind cresterea si divizarea acestora. Din acest motiv se utilizeaza in chemoterapia cancerului. El manifesta si activitate antibacteriana si amplifica efectul bactericidal al antibioticelor.



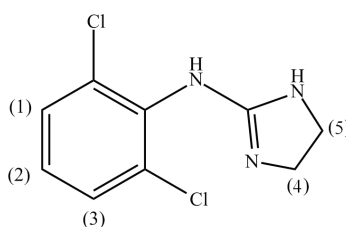
5-Fluoro-uracil

Citarabina (5) o arabino-citosina, este un agent chemoterapeutic antineoplasmatic utilizat in principal in tratarea tumorilor celulelor albe din sange precum leucemia mielitica acuta si limfomul Hodkin.



Citarabine

Clonidina (6) este un medicament simpatolitic, utilizat in tratarea tensiunii arteriale ridicate, a sindromului ADHD (attention deficit hyperactivity disorder) a anxietatii, migrenelor si a unor dureri specifice bolii de cancer.



Clonidina

Masuratori RMN

Toate masuratorile de RMN au fost efectuate pe un spectrometru Bruker AVANCE III ce opereaza la 500.13 MHz si este echipat cu un cap de proba de banda larga. In toate experimentele, temperatura a fost mentinuta la 298 K si s-au utilizat tuburi RMN cu diametrul de 5 mm. Toate solutiile au fost preparate in D₂O de 99.8 % si 50 mM bufer fosfat cu pH = 7,4. Vitezele de relaxare longitudinala selectiva s-au masurat prin intermediul secventei de revenire din inversie, 180° – τ – 90°, utilizand un puls selectiv de 180° de tipul Gauss1_180i_1000. Cu o lungime a pulsului selectiv cuprinsa intre 11,2 ms si 18,35ms si o putere de 51 dB s-a putut excita o banda de frecventa cuprinsa intre 65 si 40 Hz. Spre exemplificare prezentam in Fig.1 doua spectre RMN ale citarabinei (5), obtinute pe baza secventei

de revenire din inversie. Pulsul selectiv de 180° a fost aplicat asupra dubletului H(1), excitand o banda de frecventa de 40 Hz, centrata la $\delta = 7,634$ ppm si avand o durata de 18,35 ms, pentru doua valori ale timpului τ dintre cele doua pulsuri ale secventei si anume : $\tau = 0,1s$ si $\tau = 3s$.

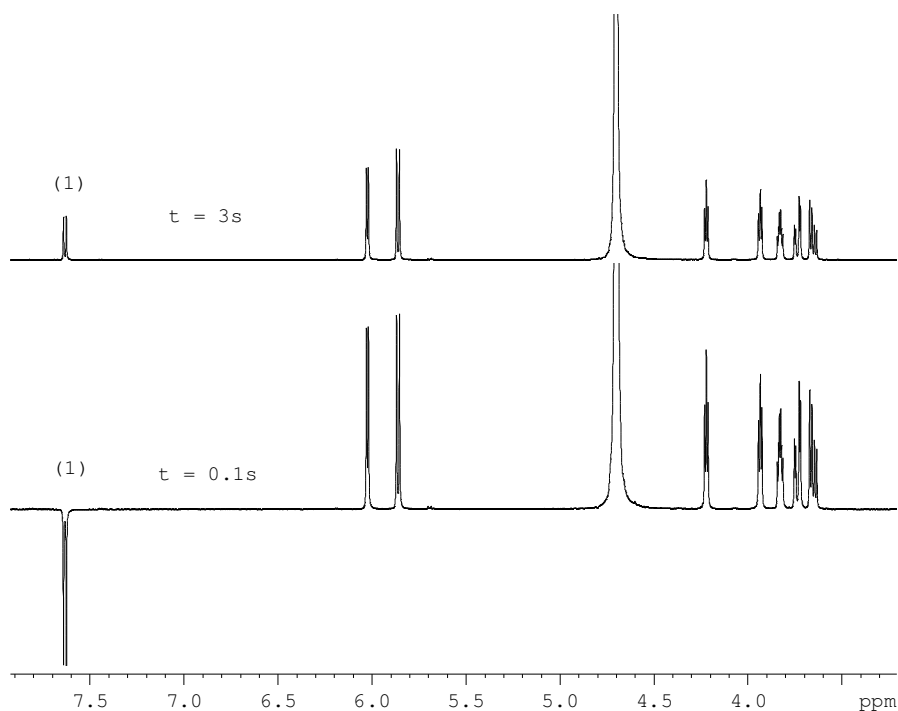


Fig.1. Spectrele RMN ale citarabinei pure, obtinute prin aplicarea scventei de revenire din inversie, cu puls selectiv de 180° aplicat la $\delta = 7,634$ ppm, pentru $\tau = 0,1s$ si $\tau = 3s$.

In cazul determinarilor experimentale ale vitezelor de relaxare longitudinala selectiva, s-au utilizat 15 valori pentru τ cu valori cuprinse intre $\tau_{\min}=0.01s$ si $\tau_{\max}= 20s$ in functie de valoarea timpului de relaxare longitudinal $T_1= 1/R_1$. Datele experimentale au fost fitate prin intermediul unei regresii exponentiale ale componentelor magnetizarii longitudinale descrise de ecuatia standard:

$$I(\tau) = I(0)[1 - 2\exp(-\tau/T_1)] \quad (1)$$

din biblioteca de programe a spectrometrului RMN. Eroarea experimentala maxima in masuratorile vitezei de relaxare selective a fost de 5%.

Rezultate experimentale

a) Sistemul naproxen – albumina serica umana

In vederea determinarii constantei de asociere, K_a , si a numarului pozitiilor de legare cu afinitate scazuta, n , ale naproxenului pe albumina serica umana (HSA), am preparat un set de 7 probe in care concentratia de albumina serica umana a fost mentinuta constanta ($C_p= 0,1$ mM) iar concentratia de naproxen (C_L) a variat intre 10 si 45 mM. Albumina serica umana (fractiunea V), precum si bioliganzii investigati in acest studiu au fost obtinuti de la Sigma-Aldrich Chemie GmbH si s-au utilizat fara purificari ulterioare. Experimental s-a urmarit dependenta vitezei de relaxare longitudinala selectiva ($R_{1,obs}$) a protonilor H(5) si H(6) ai naproxenului (Fig 2), in functie de concentratia acestuia. In ipoteza ca fiecare molecula de HSA are un numar maxim n , de pozitii de legare cu afinitate scazuta, capabile sa accepte molecule de ligand, pe baza ec. (7) din cadrul decontarii

din 2014, am dedus relatia ce descrie variatia vitezei de relaxare selectiva $R_{1,obs}$ in functie de raportul molar $x = C_p/C_L$ si anume:

$$\frac{2(R_{1,obs} - R_{1,free})}{(R_{1,bound} - R_{1,free})} = 1 + \left(\frac{K_D}{C_P}\right)\left(\frac{C_P}{C_L}\right) + n\left(\frac{C_P}{C_L}\right) - \left(\left[1 + \left(\frac{K_D}{C_P}\right)\left(\frac{C_P}{C_L}\right) + n\left(\frac{C_P}{C_L}\right)\right]^2 - 4n\left(\frac{C_P}{C_L}\right)\right)^{1/2} \quad (2)$$

in care $R_{1,bound}$ si $R_{1,free}$ reprezinta vitezele de relaxare ale protonilor naproxenului in starea legata, respectiv libera, iar $K_D = 1/K_a$ este constanta de disociere a complexului supramolecular format.

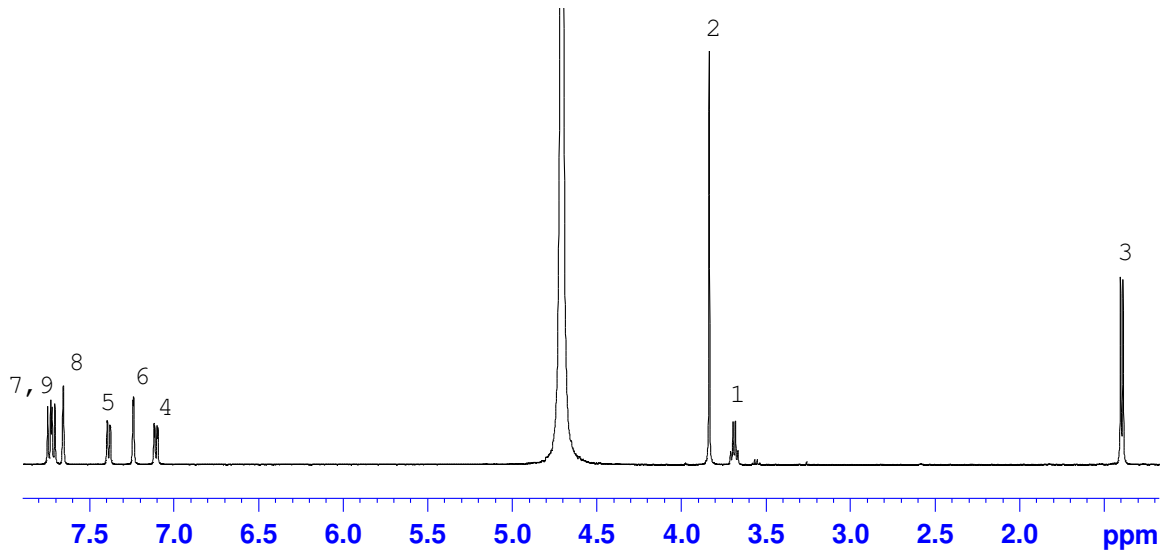


Fig.2. Spectrul RMN al naproxenului (18 mM), la T = 298 K

In cadrul unui experiment separat am dedus vitezele de relaxare selectiva ale protonilor H(5) si H(6) ai naproxenului, in absenta albuminei serice umane, rezultatele obtinute fiind:

$$R_{1,free}(H5) = 0,362 \pm 0,01 \text{ sec}^{-1}$$

$$R_{1,free}(H6) = 0,491 \pm 0,01 \text{ sec}^{-1}$$

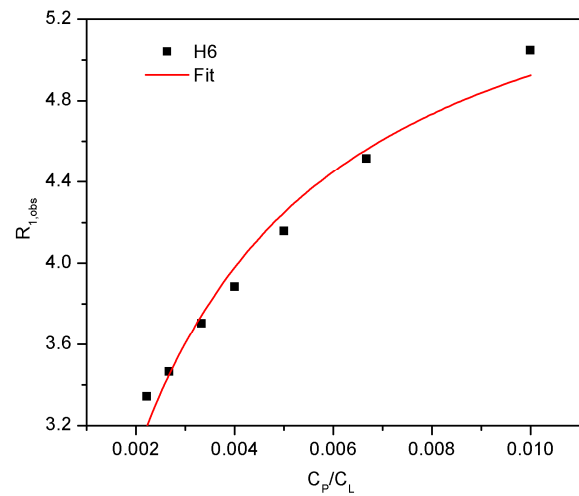
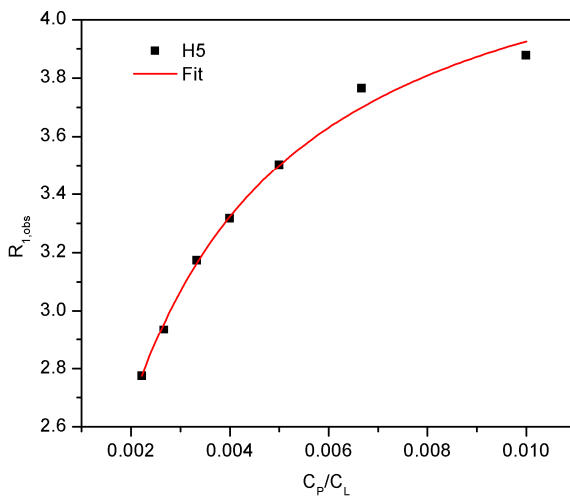


Figura 3 Dependenta vitezei de relaxare selectiva a protonilor H(5) si H(6) ai naproxenului, functie de raportul concentratiilor C_p/C_L

Variatia vitezelor de relaxare selectiva ale protonilor H(5) si H(6) ai naproxenului in functie de raportul molar C_p/C_L , prezentata in figura 3. a fost fitata cu ec. (2), parametrii de fit fiind numarul pozitiilor de legare, n , constanta de disociere K_D , respectiv viteza de relaxare a protonilor in starea legata, $R_{1, \text{bound}}$. Valorile obtinute pentru parametrii de fit sunt prezentate in tabelul 1

Tabel.1. Valorile contantei de disociere, K_D , a numarului pozitiilor nespecifice de legare, n , si a vitezei de relaxare selectiva in stare legata pentru protonii H(5) si H(6) ai naproxenului

Proton	$R_{1, \text{bound}} (\text{sec}^{-1})$	n	$K_D (\text{mM})$	r^2
H(5)	$73,3 \pm 3$	34 ± 4	$57,4 \pm 3,3$	0,992
H(6)	$69,4 \pm 5,6$	34 ± 2	$40,7 \pm 4,8$	0,969

b) Sistemul paracetamol – albumina serica umana

Interactiunea dintre paracetamol si albumina serica umana a fost investigata [3] in conditii fiziologice ($\text{pH} = 7,4$), prin spectroscopie de fluorescenta. Remarcam faptul ca s-a investigat doar interactiunea paracetamolului cu pozitiile primare de legare de pe albumina serica umana, si anume cele cu afinitate ridicata. Astfel, datele de fluorescenta au relevat faptul ca procesul de inghetare al fluorescentei HSA de catre paracetamol a avut drept rezultat formarea complexului HSA – paracetamol, caracterizat de o constanta de disociere $K_D = 0,077 \text{ mM}$ si de un numar al pozitiilor de legare $n = 2,3$. In plus, studiul teoretic de modelare moleculara a indicat faptul ca doua molecule de paracetamol sunt legate in subdomeniul III A (pozitia Sudlow II). Pentru a obtine informatii cantitative privind numarul pozitiilor de legare nespecifice de pe HSA, avand o afinitate scazuta precum si constanta de disociere a complexului macromolecular format, am realizat un studiu privind dependenta vitezei de relaxare selectiva a unor protoni ai paracetamolului, functie de concentratia acestuia, pastrand concentratia de albumina serica umana la o valoare constanta de $0,1 \text{ mM}$. In acest sens s-au preparat 9 probe in care $[\text{HSA}] = 0,1 \text{ mM} = \text{const.}$ iar concentratia de paracetamol a variat intre 2 mM si 20 mM . S-a lucrat deci cu ligand in exces pentru a satura pozitiile specifice de legare ale albuminei serice umane.

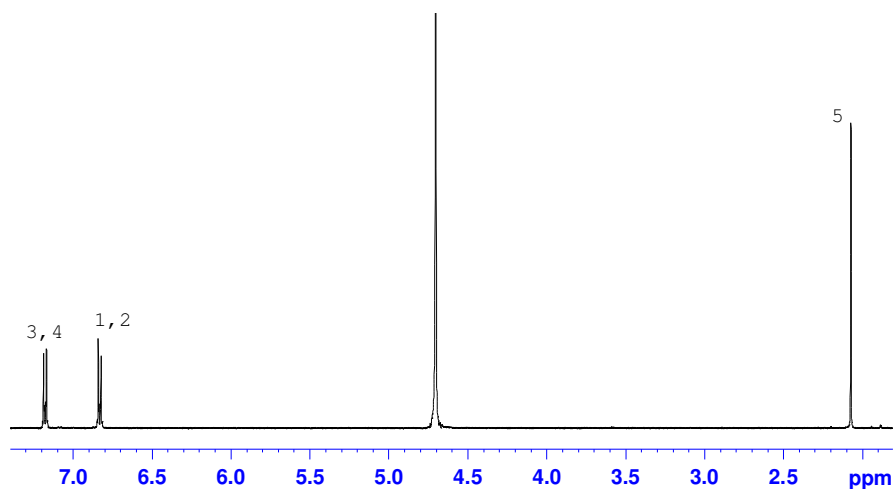


Fig.4. Spectrul RMN al paracetamolului (10 mM), la $T = 298 \text{ K}$

De asemenea am preparat o proba de paracetamol pur avand o concentratie de 10 mM, (Fig.4), pentru care s-a determinat timpul de relaxare longitudinal selectiv, $T_{1,free} = 5,362 \pm 0,007$ sec, corespunzator dubletului H(3,4) situat la $\delta = 7,17$ ppm. Aceasta valoare corespunde unei viteze de relaxare longitudinale selective, $R_{1,free} = 0,1865 \pm 0,0002 \text{ sec}^{-1}$. Variatia valorilor experimentale ale vitezelor de relaxare in functie de raportul molar C_p/C_L este prezentata in figura 5.

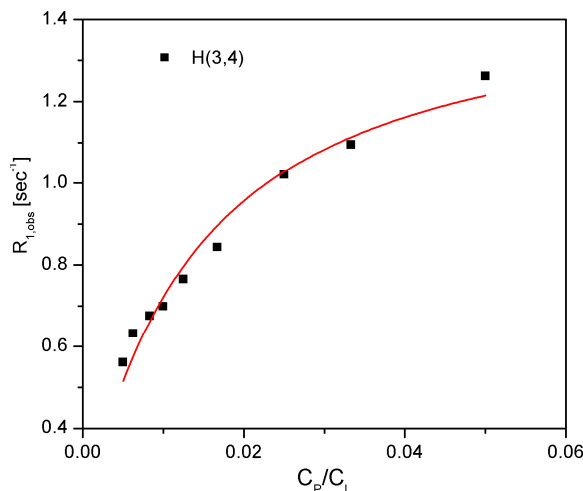


Fig.5 Variatia vitezei de relaxare selectiva a dubletului H(3,4) a paracetamolului, functie de raportul molar C_p/C_L

Aceasta dependenta a fost fitata prin intermediul ec.(2), parametrii de fit fiind $R_{1,bound}$, n si K_D . Valorile obtinute sunt:

$$K_D = 5,25 \pm 0,81 \text{ mM} \quad n = 12 \pm 1$$

$$R_{1,bound} = 7,117 \pm 0,57 \text{ sec}^{-1} \quad r^2 = 0,969$$

Analiza rezultatelor obtinute confirma faptul ca energia ce caracterizeaza taria legarii paracetamolului in pozitiile nespecifice de legare de pe albumina serica umana, este cu aproximativ doua ordine de marime mai mica decat cea caracteristica pozitiilor specifice de legare [3].

c) Sistemul salicilat de Na – albumina serica umana

Salicilatul de Na interactioneaza cu albumina serica umana in pozitiile de legare II si III, cu o distributie aproape egala [4]. Interactiunea salicilatului de Na cu albumina serica umana a fost investigata prin spectroscopie de fluorescenta [5], care a pus in evidenta interactiunea cu pozitiile primare (specifice), avand o afinitate ridicata. Pe baza graficului Schatchard s-a dedus pentru constanta de disociere valoarea $K_D = 0,54 \text{ mM}$ iar numarul pozitiilor de legare $n = 0.5$. Caracterizarea interactiunii salicilatului de Na cu pozitiile nespecifice, avand o afinitate scazuta, ale albuminei serice umane s-a realizat pe baza studiilor privind dependenta vitezei de relaxare longitudinale **neselective**, functie de concentratia salicilatului, [6,7,8]. Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul 2.

Tabel 2. Constanta de disociere si numarul pozitiilor de legare nespecifice pentru complexul salicilat/HSA determinate prin masuratori de relaxare longitudinala neselectiva

Proton	K_D (mM)	n	Bibliografie
H(4)	13±1	32	[6]
H(4), H(3,5), H(6)	4,27±0,48	35±2,3	[7]
H(4), H(3,5), H(6)	2,68±0,48	32±4	[8]

In studiul efectuat de noi, am urmarit variatia vitezei de relaxare longitudinala **selectiva**, functie de concentratia salicilatului de Na. In figura 6. prezentam zona aromatica a spectrului RMN al salicilatului. Am urmarit doar comportarea tripletului H(4), deoarece acesta prezinta cea mai pronuntata variatie a vitezei de relaxare functie de concentratia salicilatului.

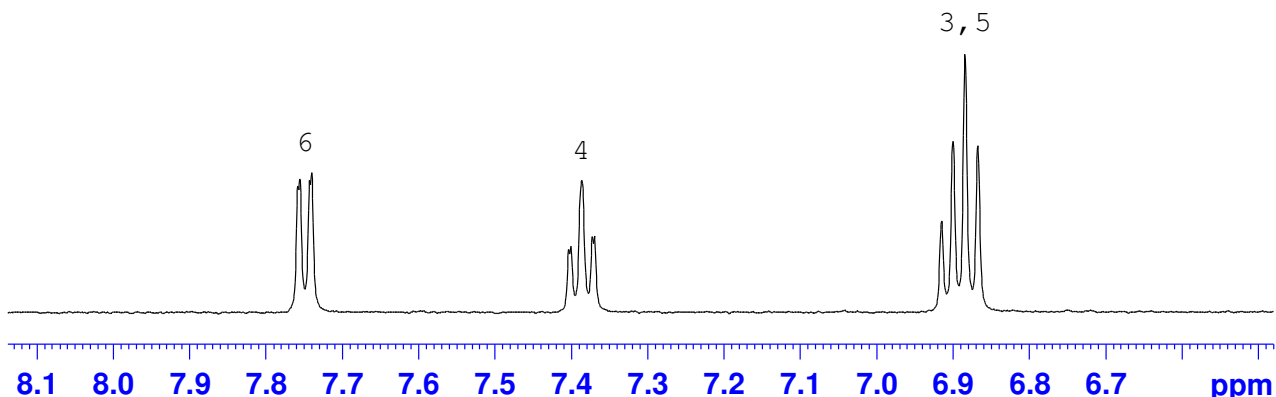


Fig.6. Zona aromatica a spectrului RMN a salicilatului de Na (10 mM), la T= 298 K

S-au preparat 7 probe in care concentratia albuminei serice umane a fost mentinuta constanta la 0,1mM iar concentratia de salicilat a variat intre 4 si 24 mM. S-a preparat de asemenea o proba de salicilat de Na pur avand concentratia de 10 mM. Aceasta proba s-a utilizat pentru a determina viteza de relaxare longitudinala selectiva $R_{1,free}$, pentru protonul H(4) si anume $R_{1,free} = 0125 \pm 0,003 \text{ sec}^{-1}$. Variatia valorilor experimentale ale vitezelor de relaxare selectiva pentru protonul H(4), in functie de raportul molar C_p/C_L este prezentata in figura 7.

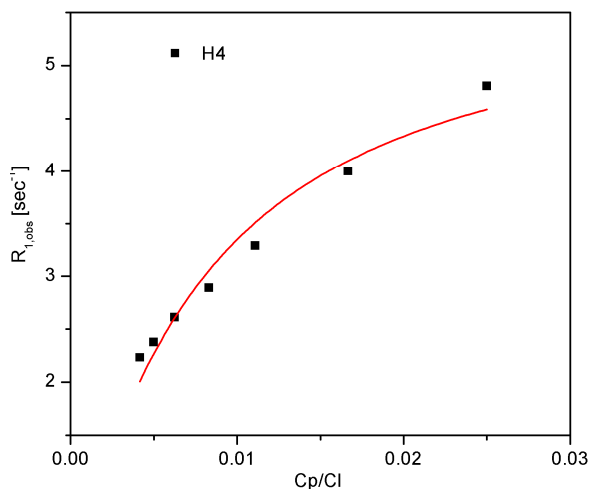


Figure 7 Variatia vitezei de relaxare selectiva a protonului H(4) a salicilatului de Na, functie de raportul molar C_p/C_L

Variatia vitezei de relaxare selectiva a protonului H(4) a salicilatului de Na in functie de raportul molar C_p/C_L , prezentat in figura 7. a fost fitata cu ec. (2), parametrii de fit fiind numarul pozitiilor de legare, n, constanta de disociere K_D , respectiv viteza de relaxare a protonilor in starea legata, $R_{1,bound}$. Valorile obtinute pentru parametrii de fit sunt :

$$\begin{aligned}
 K_D &= 6,80 \pm 1,60 \text{ mM} & n &= 36,5 \pm 1,5 \\
 R_{1,bound} &= 16,41 \pm 1,75 \text{ sec}^{-1} & r^2 &= 0,955
 \end{aligned}$$

Remarcam faptul ca valorile obtinute de noi pentru K_D si n sunt de acelasi ordin de marime cu cele deduse pe baza masuratorilor de relaxare longitudinala neselectiva si prezentate in tabelul 2.

d) Sistemul fluorouracil – albumina serica umana

5-fluorouracilul este un antineoplaastic deosebit de eficient si este utilizat pe scara larga in chemoterapia cancerului. El este transportat in organism de catre proteinele din plasama sangvina. Din acest motiv este deosebit de important studiul interactiunii acestui medicament cu albumina serica umana. Acest proces de complexare a fost investigat in special prin spectroscopie de fluorescanta si electroforeza capilara. Studiile prezente s-au axat in special pe determinarea constantei de asociere cu afinitate ridicata in conditii de stoichiometrie 1:1 ($n=1$). Cu toate acestea, rezultatele obtinute acopera o plaja larga de valori dupa cum reiese din tabelul 3.

Tab 3. Constanta de asociere K_a pentru complexul 5-fluorouracil : albumina serica umana, obtinuta prin diferite metode

Metoda	K_a (M^{-1})	Bibliografie
Fluorescenta	$0,630 \cdot 10^3$	[9]
Fluorescenta	$3,92 \cdot 10^3$	[10]
Fluorescenta	$4,38 \cdot 10^3$	[11]
Electroforeza capilara de afinitate	$65,7 \cdot 10^3$	[12]
Calorimetrie de titrare izoterma (ITC)	$146 \cdot 10^3$	[13]

Diferentele dintre valorile constantelor de asociere poate fi cauzata de: (1) conditii experimentale diferite utilizate precum temperatura, pH, concentratii de proteina si ligand diferite ;(2) principiile diferite ale acestor metode de determinare a constantelor de legare. Pentru a obtine informatii cantitative privind numarul pozitiilor de legare nespecifice de pe HSA, avand o afinitate scazuta precum si constanta de disociere a complexului macromolecular format, am realizat un studiu privind dependenta vitezei de relaxare selectiva a protonului H(1) a 5-fluorouracilului, functie de concentratia acestuia, pastrand concentratia de albumina serica umana la o valoare constanta de 0,2 mM. Conform structurii chimice a 5-fluorouracilului, acesta prezinta un singur semnal RMN situat la $\delta = 7,571$ ppm. Acest semnal este un dublet avand o constanta de cuplaj $J = 5,3$ Hz datorita interactiunii cu atomul de fluor alaturat. Am preparat un set de 7 probe in care $[HSA] = 0,2$ mM = const. iar concentratia de fluorouracil a variat intre 8 mM si 35 mM. S-a lucrat deci cu ligand in exces pentru a satura pozitiile specifice de legare ale albuminei serice umane. De asemenea am preparat o proba de 5-fluorouracil pur avand o concentratie de 18 mM, pentru care s-a determinat timpul de relaxare longitudinal selectiv, $T_{1, free} = 10,219 \pm 0,003$ sec, corespunzator dubletului H(1). Aceasta valoare corespunde unei viteze de relaxare longitudinala selective, $R_{1, free} = 0,0978 \pm 0,00003$ sec⁻¹. Variatia valorilor experimentale ale vitezelor de relaxare selectiva pentru protonul H(1) al 5-fluorouracilului, in functie de concentratia acestuia C_L , este prezentata in figura 8.

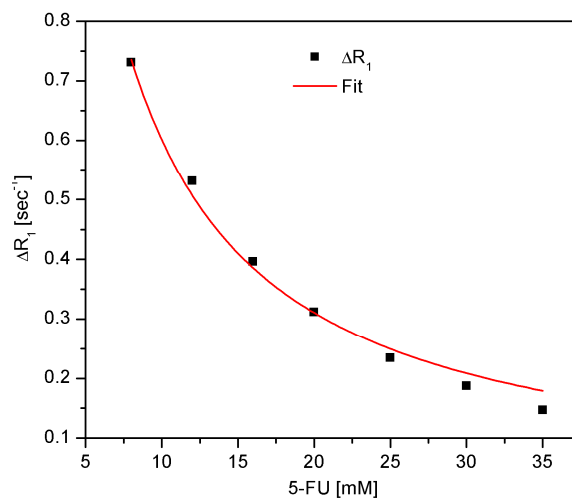


Fig.8. Variatia vitezei de relaxare longitudinala selectiva a protonului H(1) a 5-fluorouracilului, functie de concentratia C_L a acestuia

Dependenta vitezei de relaxare selectiva $R_{1,obs}$, in functie de concentratia C_L a ligandului prezentata in fig. 8, a fost fitata cu ecuatia:

$$\Delta R_1 = R_{1,obs} - R_{1,free} = (R_{1,bound} - R_{1,free}) \left[\frac{C_L + 0,2n + K_D}{2x} - \sqrt{\left(\frac{C_L + 0,2n + K_D}{2x} \right)^2 - \frac{0,2n}{C_L}} \right] \quad (3)$$

Parametrii de fit fiind numarul pozitiilor de legare n , constanta de disociere K_D , respectiv viteza de relaxare selectiva $R_{1,bound}$ a protonului H(1) in starea legata. Valorile obtinute pentru acesti parametri de fit sunt:

$$R_{1,bound} = 1,871 \text{ sec}^{-1} \quad n = 17,9 \pm 0,3 \quad K_D = 0,372 \text{ mM} \quad r^2 = 0,991$$

Valoarea constantei de asociere $K_a = 1/K_D = 2,69 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ este comparabila cu valoarea obtinuta prin spectroscopie de fluorescenta [10,11] pentru pozitiile specifice de legare ale 5-fluorouracilului. Putem concluziona ca in ambele tipuri de pozitii (specifice si nespecifice), legatura ligand – albumina serica umana este una puternica.

e) Sistemul citarabina – albumina serica umana

Citarabina, cunoscuta si sub numele de citosin – arabinoza este un agent chemoterapeutic care distruge celulele canceroase, interferand in sinteza ADN-ului. Citarabina combina o baza azotata (citosina) cu un zahar (arabinoza). Citosina in mod normal se combina cu deoxiriboza pentru a forma deoxicitidina, un component al DNA. Citosin – arabinoza este destul de similara cu deoxicitidina si poate fi incorporata in DNA, dar difera suficient pentru a ucide celula. Informatiile privind capacitatea citarabinei de a se lega de albumina serica, permit determinarea biodisponibilitatii acestui medicament, adica a cantitatii de citarabina libera, prezenta in ser. Pe baza unor experimente de spectroscopie de fluorescenta, s-a dedus ca citarabina se asociaza cu albumina serica umana (HSA), cu o constanta de asociere $K_a = 22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [14], precum si cu cea bovina (BSA) cu $K_a = 23,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [15]. In ambele cazuri stoichiometria presupusa a fost de 1:1 ($n=1$), caracteristica pozitiilor de legare cu

afinitate ridicata. Pentru a obtine informatii cantitative privind numarul pozitiilor de legare nespecifice de pe HSA, avand o afinitate scazuta precum si constanta de disociere a complexului macromolecular format, am realizat un studiu privind dependenta vitezei de relaxare selectiva a unor protoni ai citarabinei, functie de concentratia acesteia, pastrand concentratia de albumina serica umana la o valoare constanta de 0,2 mM. In acest sens s-a preparat un set de 9 probe in care concentratia de citarabina a variat intre 4 si 45 mM. Experimental s-a urmarit dependenta vitezei de relaxare longitudinala selectiva ($R_{1,obs}$) a protonilor H(5) si H(6) ai citarabinei (Fig 9), in functie de concentratia acesteia.

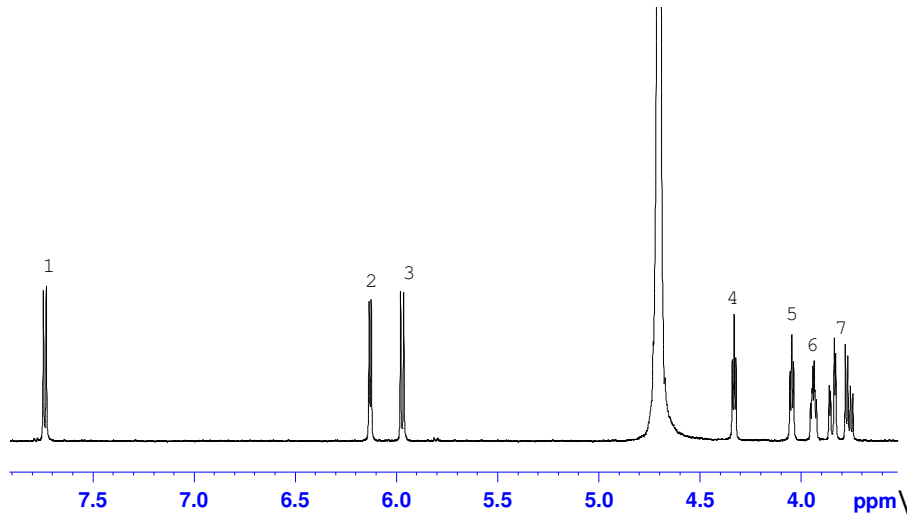


Fig. 9. Spectrul RMN al citarabinei (10 mM), la T = 298 K

Variatia valorilor experimentale ale vitezelor de relaxare selectiva pentru protonii H(5) si H(6) ai citarabinei, in functie de concentratia acesteia C_L , este prezentata in figura 10. In cadrul unui experiment separat am dedus vitezele de relaxare selectiva ale protonilor H(5) si H(6) ai citarabinei, in absenta albuminei serice umane, rezultatele obtinute fiind:

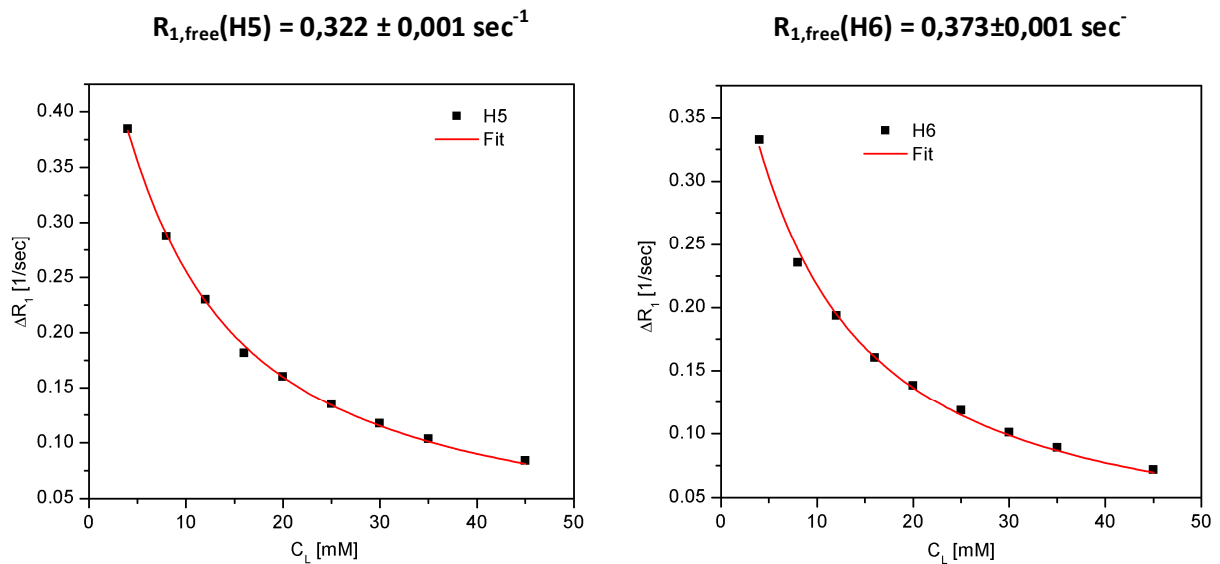


Figura 10 Dependenta vitezei de relaxare selectiva a protonilor H(5) si H(6) ai citarabinei, functie de concentratia acesteia

Am optat pentru monitorizarea vitezelor de relaxare selectiva ale protonilor H(5) si H(6), deoarece s-a demonstrat [14] ca citosina nu se leaga de albumina serica umana, in timp ce citarabina care are in structura sa arabinoza, este capabila sa formeze un complex stabil cu albumina serica. Dependenta vitezei de relaxare selectiva $R_{1,obs}$, in functie de concentratia C_L a citarabinei prezentata in fig. 10, a fost fitata cu ecuatia (3), parametrii de fit fiind constanta de disociere, K_D , numarul pozitiiilor de legare, n , precum si viteza de relaxare selectiva in starea legata, $R_{1,bound}$. Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul 4.

Tabel 4. Numarul pozitiiilor de legare, constanta de disociere si viteza de relaxare selectiva in starea legata pentru complexul citarabina : HSA

Proton	K_D (mM)	n	$R_{1,bound}$ (sec ⁻¹)	r^2
H(5)	4,91±0,16	13,8±0,2	1,80	0,999
H(6)	5,20±0,31	12,3±0,3	1,80	0,996

Deoarece valorile obtinute pentru H(5) si H(6) sunt foarte esemanatoare, consideram ca interactiunea citarabina : albumina serica umana poate fi caracterizata de valorile medii ale pozitiiilor de legare, respectiv ale constantei de disociere si anume:

$$n = 13,05 \pm 0,25$$

$$K_D = 5,06 \pm 0,23 \text{ mM}$$

f) Sistemul flououracil – citarabina - albumina serica umana

Investigarea prin RMN a acestui sistem ternar permite evaluarea cantitativa a procesului competitiv de legare intre 5-fluorouracil si citarabina de albumina serica umana. Din literatura de specialitate [16], se cunoa faptul ca atat 5-fluorouracilul cat si citarabina leaga in pozitia I a albuminei serice umane (subdomeniul II A). Avand pozitii comune de legare, monitorizarea variatiei vitezei de relaxare selectiva a protonilor unui ligand L, in functie de concentratia ligandului competitiv C, permite determinarea constantei de disociere a ligandului competitiv, in prezenta lui L. In vederea derularii unui astfel de experiment, trebuie determinat initial, intr-un experiment de legare necompetitiv, $K_D(L)$, $R_{1,free}(L)$ si $R_{1,bound}(L)$. In cel de-al doilea experiment se pastreaza concentratia ligandului L si a albuminei serice umane constanta si se variaza concentratia ligandului C permitand astfel determinarea constantei de disociere $K_D(C)$. In cazul particular al sistemului nostru, primul experiment a constatat in determinarea lui $R_{1,free}(5-Fu)$, $R_{1,bound}(5-Fu)$ si $K_D(5-Fu)$. Rezultatele obtinute au fost prezentate in sectiunea (d) a prezentei decontari. Pentru cel de-al experiment am preparat un set de 7 probe in care:

$$[hsa] = [P_0] = 0.2 \text{ mM} = \text{ct.}$$

$$[L_0] = [5-Fu] = 10 \text{ mM} = \text{ct.}$$

$$[C_0] = [Cit] \text{ si variaza intre } 4\text{mM si } 30 \text{ mM}$$

Experimental s-a monitorizat viteza de relaxare selectiva a protonului H(1) al 5-fluorouracilului, in functie de concentratia citarabinei. Conditiiile experimentale au fost identice cu cele utilizate in experimentele descrise in sectiunile (a) – (e). In cele ce urmeaza vom deduce expresia teoretica a

variatiei vitezei de relaxare selectiva a protonului ligandului L , functie de concentratia ligandului competitiv C , la o concentratie constanta de HSA. Conform ec. (4) din decontarea anterioara, daca lucram cu ;ligandul L in exces, vom avea:

$$\frac{R_{1,obs} - R_{1,free}}{[P_0]} = \frac{R_{1,bound} - R_{1,free}}{[L_0] + K_D(L)} \quad (4)$$

Daca definim:

$$K_D(L) = \frac{([P_0] - [PL] - [PC])([L_0] - [PL])}{[PL]} \quad (5)$$

$$K_D(C) = \frac{([P_0] - [PL] - [PC])([C_0] - [PC])}{[PC]} \quad (6)$$

Din raportul ec. (5) si (6) rezulta ca:

$$\frac{K_D(L)}{K_D(C)} = \frac{([L_0] - [PL])[PC]}{([C_0] - [PC])[PL]} \quad (7)$$

iar din ec.(5) avem:

$$[PL] = \frac{[P_0]}{\frac{K_D(L)}{[L_0] - [PL]} + \frac{[PC]}{[PL]} + 1} \quad (8)$$

Substituind in ec. (8) expresia lui $[PC]/[PL]$ din ec. (7) va rezulta pentru $[PL]$ expresia:

$$[PL] = \frac{[P_0]([L_0] - [PL])}{K_D(L) + \frac{K_D(L)}{K_D(C)}([C_0] - [PC]) + ([L_0] - [PL])} \quad (9)$$

Daca lucram cu ambii liganzi in exces, vom avea:

$$[PL] = \frac{[P_0][L_0]}{K_D(L) + \frac{K_D(L)}{K_D(C)}[C_0] + [L_0]} \quad (10)$$

Deoarece fractia de molecule legate $\chi_b = [PL]/[L_0] = (R_{1,obs} - R_{1,free})/(R_{1,bound} - R_{1,free})$, in final vom avea:

$$\frac{R_{1,obs} - R_{1,free}}{R_{1,bound} - R_{1,free}} = \frac{[P_0]}{[C_0] \frac{K_D(L)}{K_D(C)} + K_D(L) + [L_0]} \quad (11)$$

Ec. (11) poate fi rearanjata sub forma:

$$\frac{[P_0]}{(R_{1,obs} - R_{1,free})} = \frac{[C_0] \frac{K_D(L)}{K_D(C)} + K_D(L) + [L_0]}{(R_{1,bound} - R_{1,free})} \quad (12)$$

sau mai exact

$$\frac{[P_0]}{(R_{1,obs} - R_{1,free})} = \frac{K_D(L)}{K_D(C)(R_{1,bound} - R_{1,free})}[C_0] + \frac{K_D(L) + [L_0]}{(R_{1,bound} - R_{1,free})} \quad (13)$$

Conform ec. (13), reprezentarea grafica a termenului $[P_0]/(R_{1,obs} - R_{1,free})$ in functie de $[C_0]$ este o dreapta a carui panta este $m = K_D(L)/K_D(C)(R_{1,bound} - R_{1,free})$. In cazul nostru $[P_0] = [hsa]$, $[C_0] = [Cit]$, $[L_0] = [5-Fu]$ si $K_D(L) = K_D(5-Fu)$. Valorile lui $R_{1,free}$, $R_{1,bound}$ si $K_D(5-Fu)$ pentru 5-fluorouracil au fost deduse in sectiunea (d) a prezentei decontari. In figura 11 este reprezentata dependenta termenului $[hsa]/(R_{1,obs} - R_{1,free})$ in functie de concentratia citarabinei

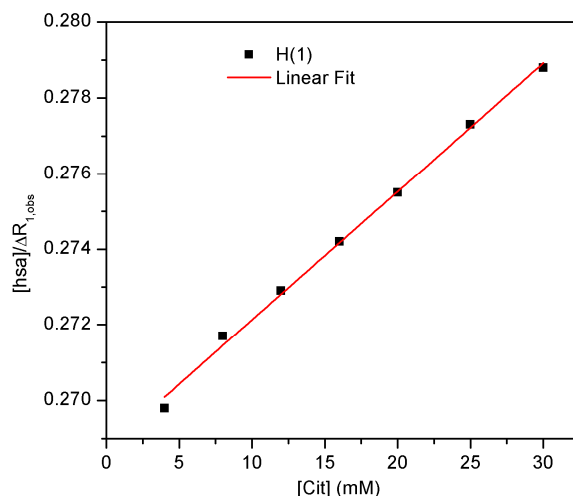


Fig.11. Dependenta variatiei vitezei de relaxare selectiva a protonului H(1) al 5-fluorouracilului, functie de concentratia citarabinei

Fitarea datelor experimentale cu o ecuatie liniara de tipul $y = (mx + n)$, a condus la urmatoarele rezultate:

$$m = 3,3946 \cdot 10^{-4} \text{ sec} \quad n = 0,2687 \text{ mM} \cdot \text{sec} \quad r^2 = 0,9964$$

Din valoarea obtinuta pentru panta m a rezultat pentru constanta de disociere valoarea:

$$K_D(\text{cit}) = 616,7 \text{ mM}$$

In cazul experimentelor de complexare directa (necompetitiva) rezultatele obtinute pentru constantele de asociere $K_a = 1/K_D$ in cadrul sectiunilor (d) si (e) au fost:

$$K_a(5-Fu) = 2688,2 \text{ M}^{-1} \quad K_a(\text{cit}) = 197,6 \text{ M}^{-1}$$

Rezulta ca in cazul acestor doi bioliganzi, 5-fluorouracilul este mult mai puternic legat de albumina serica umana decat citarabina. In cazul complexarii competitive, in prezenta 5-fluorouracilului, citarabina leaga foarte slab de albumina, constanta sa de disociere fiind aproximativ cu 2 ordine de marime mai mare decat valoarea caracteristica legarii directe. Deoarece ambii bioliganzi se leaga in subdomeniul IIA al albuminei serice umane, rezulta ca citarabina nu este capabila sa substituie 5-fluorouracilul din pozitiile sale de legare decat intr-o masura extrem de redusa.

g) Sistemul clonidina – albumina serica umana

In vederea investigarii interactiunii dintre clonidina si albumina serica umana s-a preparat un set de 8 probe in care concentratia de albumina serica a fost mentinuta constanta la 0,1 mM, iar cea de clonidina a variat intre 8 mM si 50 mM. A fost monitorizata variatia vitezei de relaxare selectiva a protonului H(2) al clonidinei (fig.b 12) in functie de concentratia acesteia.

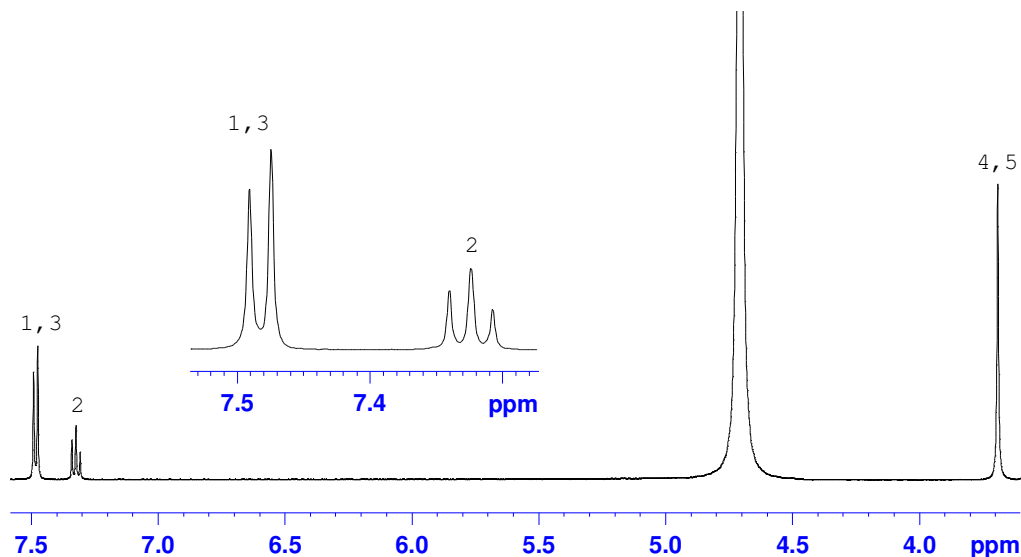


Fig. 12. Spectrul RMN al clonidinei (10 mM), la T = 298 K

Pe intreg domeniul de concentratie investigat, viteza de relaxare selectiva a variat intre 0,5510 sec^{-1} pentru $[\text{Clo}] = 50 \text{ mM}$, respectiv 0,5767 sec^{-1} pentru $[\text{Clo}] = 8 \text{ mM}$. Cele doua valori extreme obtinute difera intre ele cu 4,5%, incadrandu-se astfel in eroarea de masura a vitezei de relaxare care este de 5%. Mentionam de asemenea faptul ca experimentele de inghetare ale fluorescentei albuminei serice umane in prezenta clonidinei, nu au pus in evidenta interactiunea celor doi compusi.

Stadiul actual al cercetarii si propuneri pentru continuarea proiectului

Au fost atinse toate obiectivele prevazute pana in etapa prezenta. Urmatoarele activitati prevazute in derularea cercetarii vizeaza studiul RMN al competitivitatii in cazul prezentei unui ligand si a doi receptori (HSA si β -CD,

Bibliografie

- [1] M. Bogdan, A. Pirnau, C. Floare, Carmen Bugeac, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 981 (2008)
- [2] Silvia Neamtu, Nicoleta Tosa, M. Bogdan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **85**, 277 (2013)
- [3] P. Daneshgar, A. A. Moosavi-Mohavedi, P. Norouzi, M. R. Ganjali, A. Madadkar-Sobhani, A. A. Sabouri, *Int. J. Biol. Macromol.*, **45**, 129 (2009)

- [4] X. M. He, D.C. Carter, *Nature* **358**, 209 (1992)
- [5] B. Bojko, A. Sulkowska, M. Maciazek, J. Rownicka, F. Njau, W. Sulkowski, *Int. J. Biol. Macromol.*, **42**, 314 (2008)
- [6] R. S. Luo, M.L. Liu, X. A. Mao, *Spectrochim. Acta A*, **55**, 1897 (1999)
- [7] Y. F. Cui, G.Y. Bai, C.G. Li, C.H. Ye, M.L. Liu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34**, 247 (2004)
- [8] G.Y. Bai, Y.F. Cui Y.H. Yang, C.H. Ye, M.L. Liu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**, 588 (2005)
- [9] S. Bakkialakshmi, D. Chandrakala, *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **4**, (5) 46 (2012)
- [10] A. Sulkowska, J. Rownicka, B. Bojko, W. Sulkowski, *J. Mol. Struct.*, **651-653**, 133 (2003)
- [11] J.X. Lu, G.Z. Zhang, Y.M. Wang, *Chin. J. Anal. Chem.*, **29**, 192 (2001)
- [12] H.W. Sun, Y.Y. Wu, P. He, Y.L. Zuo, Y.K. Lv, *Asian J. Pharm. Sci.*, **7** (1), 75 (2012)
- [13] L.W. Li, D.D. Wang, D.Z. Sun, M. Liu, X.K. Qu, *Acta Chim. Sinica*, **65** (24), 2853 (2007)
- [14] G.Datta, S. Gurnani, N. Suryaprakash, K.V. Ramanathan, C.L. Khetrapal, *FEBS Lett.*, **148**, 276 (1982)
- [15] A. Sulkowska, B. Bojko, J. Rownicka, W. Sulkowski, *Biopolymers*, **81**, 464 (2006)
- [16] F. Yang, Y. Zhang, H.M. Liang, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 3580 (2014)

Director proiect,

