Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie – octombrie 2016

Etapa VI 04. 10. 2016

Studiul RMN al competitivitatii in cazul prezentei unui ligand si a doi receptori (HSA si β-CD)

1. *Deducerea expresiei analitice a constantelor de asociere in cazul legarii competitive a unui bioligand in prezenta a doi receptori*

Spre deosebire de interactiunea competitiva la legarea a doi bioliganzi de o macromolecula, interactiune tratata in raportul stiintific din 2014, in cele ce urmeaza vom analiza pentru inceput, din punct de vedere teoretic, interactiunea unui bioligand cu doi receptori macromoleculari, prezenti simultan in solutie. Pentru inceput vom trece pe scurt in revista modelul de legare a unui bioligand (L), de un receptor macromolecular (M). Afinitatea si capacitatea de legare a bioligandului de macromolecula poate fi descrisa prin intermediul constantei de asociere a complexului molecular format. In cazul utilizarii metodei RMN, analiza teoretica a procesului de complexare se bazeaza pe existenta unui model de echilibru in solutie descris de reactia:

$$M + L \leftrightarrow ML \qquad (1)$$

Constanta de asociere in cazul unei stoichiometrii 1:1, se defineste prin intermediul urmatoarelor relatii:

$$K_a = \frac{[ML]}{[M][L]} \qquad [M]_t = [M] + [ML] \qquad [L]_t = [L] + [ML] \qquad (2)$$

unde $[M]_t$ si $[L]_t$ reprezinta concentratia totala de macromolecule respectiv bioligand, iar [H], [L] si [ML] reprezinta concentratiile macromoleculei, ligandului si a complexului la echilibru. In cazul unui experiment de RMN parametrul spectral observat poate fi deplasarea chimica δ, viteza de relaxare longitudinala R_1 sau ceficientul de difuzie D. In cele ce urmeaza vom nota acest parametru spectral cu X. In cazul unui schimb rapid al ligandului intre starea libera si starea legata , parametrul spectral observat reprezinta o medie ponderata a acestuia intre starea libera si cea legata conform relatiei:

$$X_{obs} = f_f X_f + f_b X_b \qquad f_f + f_b = 1 \qquad (3)$$

unde $f_f = [L]/[L]_t$ si $f_b = [ML]/[L]_t$ reprezinta fractiile molare ale ligandului in faza libera si cea legata.

Substituind relatiile (2) si (3) in expresia constantei de asociere vom obtine o ecuatie de grad II si anume:

$$[L]_t f_b^2 - f_b\{[L]_t + [M]_t + K_d\} + [M]_t = 0 \quad \text{unde} \quad K_d = 1/K_a \qquad (4)$$

Solutia cu sens fizic a acestei ecuatii este:

$$f_b = \alpha - (\alpha^2 - \beta)^{1/2} \quad \text{unde } \alpha = \{[L]_t + [M]_t + K_d\}/2[L]_t \text{ iar } \beta = [M]_t/[L]_t \qquad (5)$$

Tinand cont de relatia dintre fractiile molare (ec.3), rezulta ca $f_b = (X_{obs} - X_f)/(X_b - X_f)$ care se introduce in ec. (5). Prin intermediul unei fitari neliniare a dependentei lui X_{obs} functie de $[L]_t$ se pot deduce ca si parametrii de fit valorile lui $K_d = 1/K_a$ si X_b.

Legarea competitiva

In cazul complexarii competitive vom trata initial cazul complexarii unui bioligand L ,cu albumina serica umana ,P. Pornind de la ec.(2) vom avea:

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{\{[P]_t - [PL]\}\{[L]_t - [PL]\}}{[PL]} \qquad (6)$$

Deoarece se lucreaza cu ligand in exces, vom avea indeplinita relatia $[L]_t >> [P]_t$ iar ec.(6) poate fi scrisa sub forma:

$$K_d = \frac{\{[P]_t - [PL]\}[L]_t}{[PL]} = \frac{[P]_t[L]_t - [PL][L]_t}{[PL]} = \frac{[P]_t[L]_t}{[PL]} - [L]_t \qquad (7)$$

Aceasta ecuatie poate fi pusa sub forma:

$$\frac{[PL]}{[L]_t} = \frac{[P]_t}{K_d + [L]_t} \qquad (8)$$

In etapa urmatoatre vom analiza teoretic cazul complexarii bioligandului L, cu receptorul β-CD ,(H), in prezenta celuilalt receptor si anume albumina serica umana, (P). Vom considera cazul in care albumina serica umana si bioligandul au o concentratie constanta iar concentratia de β-ciclodextrina variaza. Cu alte cuvinte $[P]_t$ = ct ; $[L]_t$ = ct iar $[H]_t$ = variabil. In aceasta situatie, o parte din ligandul L se va lega de albumina serica umana, P. In urma acestui proces, concentratia ligandului ramas liber (nelegat) poate fi exprimata sub forma $[L'_0]$ = $[L]_t$ – [PL]. Ligandul ramas in stare libera se poate lega de al doilea receptior si anume de β-ciclodextrina. Substituind in ecuatia de mai sus, concentratia ligandului legat de albumina serica umana (ec. 8), rezulta ca :

$$[L'_0] = [L]_t - \frac{[P]_t[L]_t}{K_d(1) + [L]_t} \qquad (9)$$

unde $K_d(1)$ reprezinta constanta de disociere a complexului bioligand – albumina serica umana. In cazul procesului de complexare dintre bioligandul ramas in stare libera (necomplexat) si receptorul β-CD, avem indeplinite simultan urmatoarele relatii:

$$[L'_0] = [L]_t\{1 - \frac{[P]_t}{K_d(1) + [L]_t}\} = Q = ct.$$

$$[L'] = [L'_0] - [HL'] = Q - [HL'] \qquad (10)$$

unde [L′] reprezinta concentratia de ligand ramas liber dupa complexarea de cel de-al doilea receptor H, in cazul nostru β-ciclodextrina. Iar [HL′] ester concentrtia complexului bioligand - β-ciclodextrina. In

aceasta situatie putem defini o noua constanta de disociere $K_d(2)$, a com plexului bioligand – β-CD si anume :

$$K_d(2) = \frac{[H][L']}{[HL']} \tag{11}$$

Rearanjand ec.(11) vom avea:

$$K_d(2)[HL'] = [H][L'] = \{[H]_t - [HL']\}\{Q - [HL']\} \tag{12}$$

Dupa calcule algebrice relativ simple se ajunge la o ecuatie de gradul II de forma:

$$[HL']^2 - [HL']\{Q + [H]_t + K_d(2)\} + Q[H]_t = 0 \tag{13}$$

a carei solutie cu sens fizic este:

$$[HL'] = \frac{Q + [H]_t + K_d(2) - \{(Q + [H]_t + K_d(2))^2 - 4Q[H]_t\}^{1/2}}{2} \tag{14}$$

Experimental vom observa variatia unui parametru spectral X, a bioligandului in functie de concentratia receptorului β-ciclodextrina si in prezenta unei concentratii constante a receptorului albumina serica umana. In cazul unui schimb chimic rapid intre starea legata a bioligandului de β-ciclodextrina si cea libera , vom avea:

$$X^L_{obs} = \frac{[L']}{[L'_0]} X^L_f + \frac{[HL']}{[L'_0]} X^L_b \tag{15}$$

Daca se tine cont de cea de-a doua parte a ec.(10), dupa calcule relativ simple rezulta ca :

$$\frac{X^L_{obs} - X^L_f}{X^L_b - X^L_f} = \frac{[HL']}{[L'_0]} = \frac{[HL']}{Q} \tag{16}$$

Substituind in ec.(16) expresia solutiei ecuatie de grad II (ec. 14) obtinem :

$$\frac{X^L_{obs} - X^L_f}{X^L_b - X^L_f} = \frac{Q + [H]_t + K_d(2) - \{(Q + [H]_t + K_d(2))^2 - 4Q[H]_t\}^{1/2}}{2Q} \tag{17}$$

Fitarea neliniara a datelor experimentale $\left(X^L_{obs} - X^L_f\right)$ in functie de concentratia $[H]_t$ a β-CD, va furniza parametrii de fit $K_d(2)$ si X^L_b , ce caracterizeaza procesul competitiv de legare a bioligandului L, de receptorul β-ciclodextrina in prezenta celuilalt receptor, albumina serica umana. Practic am efectuat acest tip de experiment, utilizand ca metoda rezonanta magnetica nucleara (RMN) iar parametrul spectral investigat a fost deplasarea chimica δ. In cazul experimentelor de legare competitiva a unui bioligand de albumina serica umana in absenta sau prezenta celui de-al doilea receptor (β-ciclodextrina) am utilizat drept metoda spectroscopia de fluorescenta si anume procesul de “inghetare” al fluorescentei albuminei serice umane cauzate de complexatrea acesteia cu bioligandul investigat.

2.Realizarea de masuratori de titrare RMN in vederea determinarii principalilor parametri ce caracterizeaza procesul de legare competitiva

Este bine cunoscut faptul ca transportul si eficacitatea medicamentelor in organismul uman sunt puternic influentate de catre legarea acestora de albumina serica umana. Din acest motiv este imporant studiul interactiunii medicamentelor de albumina serica umana, interactiune ce joaca un rol major in farmacocinetica si farmacodinamica. Desi studiile privind legarea bioliganzilor de proteine abunda in literatura de specialitate, rapoarte privind influenta β-ciclodextrinei asupra legarii medicamentelor de albumina serica umana sunt extrem de rare [1-3]. In plus, conform cunostiintelor noastre, influenta albuminei serice umane asupra formarii complexului bioligand- β-ciclodextrina nu a fost raportata pana in prezent in literatura de specialitate. β-ciclodextrina este o oligozaharida ciclica compusa din sapte unitati de glucopiranoza. Ea poate fi reprezenta sub forma unui trunchi de con ce prezinta o cavitate interna hidrofoba, in timp ce suprafata exterioara este hidrofila. β-ciclodextrina formeaza complecsi de incluziune cu diferite biomolecule prin includerea in cavitatea sa interna a intregii molecule sau a unei parti din aceasta [4-8]. Deoarece ciclodextrina trasporta medicamentele si contribue la eliberarea lor sustinuta in organism, studiul stoichiometriei complexului de incluziune, a tariei legaturii si a modului de legare prezinta o importanta deosebita. Acest gen de informatii pot fi corelate cu abilitatea de complexare a albuminei serice umane (HSA), in vederea intelegerii farmacocineticii medicamentului in forma sa complexata cu ciclodextrina. Rezultatele pot furniza informatii noi cu privire la influenta ciclodextrinei asupra proprietatilor si functionalitatii complecsilor de HSA- bioligand. In cele ce urmeaza vom prezenta rezultatele investigatiilor noastre bazate pe tehnici spectroscopice privind interactiunea tolmetinului (TOL), un medicament non-steroidal anti=inflamator cu β-ciclodextrina, in absenta si prezenta HSA. Tolmetinul este utilizat in vederea descresterii nivelului de hormoni ce cauzeaza durerea, transpiratia si rigiditatea caracteristica bolilor musculare. Procesul de complexare dintre TOL si β-CD (Fig.1) in solutie, precum si influenta HSA asupra stabilitatii complexului de incluziune a fost investigata prin intermediul spectroscopiei ^{1}H NMR.

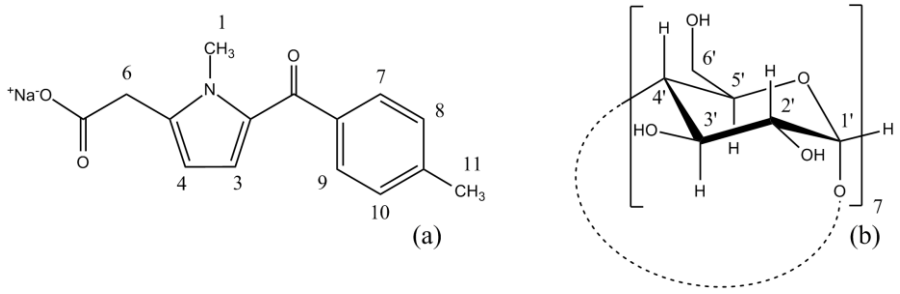

Fig.1 Structura chimica a (a) TOL si (b) β-CD. Numerotarea corespunde pozitiilor protonilor la care se face referire in studiul RMN.

Stoichiometria si constantele de stabilitate s-au determinat pe baza variatiei induse a deplasarilor chimice corespunzatoare protonilor moleculei de β-CD, respectiv TOL. De asemenea s-a investigat, utilizand metode specifice spectroscopiei de fluorescenta, procesul de legare dintre TOL si HSA in absenta si prezenta β-CD.

2.1 Aparatura

Toate masuratorilede ^{1}H RMN au fost efectuate pe un spectrometru Bruker AVANCE III ce opereaza la o frecventa de 500,13 MHz pe proton si echipat cu un cap de proba de banda larga. Spectrele RMN s-

au inregistrat in solutie tamponata (Tris-DCl 20 mM, pH = 7,40) de D_2O la 298 K si toate deplasarile chimice s-au masurat relativ la TMS. Pentru fiecare experiment s-au acumulat cate 32 de semnale de inductie nucleara libera pe un domeniu spectral de 4000 Hz . Spectrul 2D ROESY s-a achizitionat in modul senzitiv la faza cu suprimarea semnalului rezidual de H_2O. Spectrul consta dintr-o matrice 4K/4k de date punctuale ce acopera un domeniu spectral de 3500 Hz. S-a utilizat un timp mixaj de 400 ms si s-au acumulat cate 8 treceri prin rezonanta. Spectrele de fluorescenta s-au obtinut prin intermediul unui spectrofluorimetru JASCO-6500 echipat cu lampa de xenon si celule de cuart avand drumul optic de 1,0 cm. Spectrele de emisie de fluorescenta s-au inregistrat pe domeniul 210 – 500 nm, prin excitarea cu λ_{exc} = 295 nm. Latimea de banda la excitare si emisie a fost setata la 3nm/5nm iar intensitatea fluorescentei a fost corectata pentru efectul de filtru intern [9]. Spectrele de absorbtie UV-vis s-au inregistrat pe domeniul 250 – 500 nm cu un spectrofotometru JASCO-550 echipat cu celule de cuart avand drumul optic de 1,0 cm. Spectrele de fluorescenta sincrona s-au inregistrat de la 280 la 330 nm ($\Delta\lambda$ = 15nm) si de la 310 la 380 nm ($\Delta\lambda$ = 60nm).

2.2 Prepararea solutiilor

In vederea studierii procesului de complexare dintre tolmetin si β-CD in solutie prin RMN, au fost preparate doua solutii stoc de tolmetin si β-CD fiecare avand o concentratie de 10 mM in D_2O tamponata. Pe baza acestor solutii echimolare au fost preparate o serie de probe ce contin tolmetin si β-CD in diverse proportii. Procedeul a constat in amestecarea celor doua solurii la volum constant in diverse proportii astfel incat sa fie acoperit un domeniu complet ($0 < r < 1$) de fractii molare $r = [X]/([G] + [H])$ .X =H sau G iar [H] si [G] sunt concentratiile moleculei gazda (β-CD) respectiv oaspete (TOL). In acest mod concentratia totala $[H]_t + [G]_t = 10$ mM a fost mentinuta constanta pentru fiecare proba. Acest set de probe a fost utilizat atat pentru determinarea stoichiometriei complexului de incluziune format, cat si pentru evaluarea constantei de asociere, K_a. In vederea studierii influentei albuminei serice umane asupra stabilitatii complexului de incluziune TOL - β-CD, au fost preparate doua seturi de probe. Primul set contine HSA si TOL avand concentratii constante de 4μM si respectiv 1mM iar concentratia de β-CD a variat intre 0 si 8mM. In cel de-al doilea set deprobeconcentratia de HSA si TOL a fost mentinuta constanta la 10μM respectiv 1mM,in timp ce concentratia de β-CD a variat intre 0 si 10mM. In cazul masuratorilor de spectroscopie de fluorescenta, solutiile sau fost preparater utilizand apa distilata is Tris-HCl drept tampon. Solutiile au fost preparate prin diluarea corespunzatoare a solutiilor stoc de TOL, HSA si β-CD. Astfel, o solutie stoc de 4μM de HSA a fost preparata in 20 mMde solutie tampon. Titrarea de legare a HSA cu TOL s-a realizat prin adaugarea succesiva a unor concentratii diferite de TOL intre 0 si 24μM. In mod similar au fost preparate trei seturi de probe pentru titrarea HSA cu TOL - β-CD. Probele au fost preparate pastrand comcentratia de HSA constanta (4μM) si adaugand in mod succesiv, concentratii diferite de TOL intre 0 si 24μM, in prezenta β-CD la 0,35mM, 0,70mM si 1,40mM

2.3 Complexul de incluziune al tolmetinului cu β-CD

RMN in solutie evidentiaza cel mai direct includerea unei molecule oaspete in cavitatea hidrofoba a β-CD. Procesul de incluziune al moleculelor de TOL in cavitatea β-CD este evidentiat de catre modificarea deplasarilor chimice ale unor protoni caracteristici moleculei oaspete respectiv gazda, in comparatie cu deplasarile chimice ale acelorasi protoni in componentii aflati in stare libera. Variatia deplasarilor

chimice pentru unii protoni reprezentativi ai β-CD si TOL , in functie de concentratia lor este prezentata in Fig.2

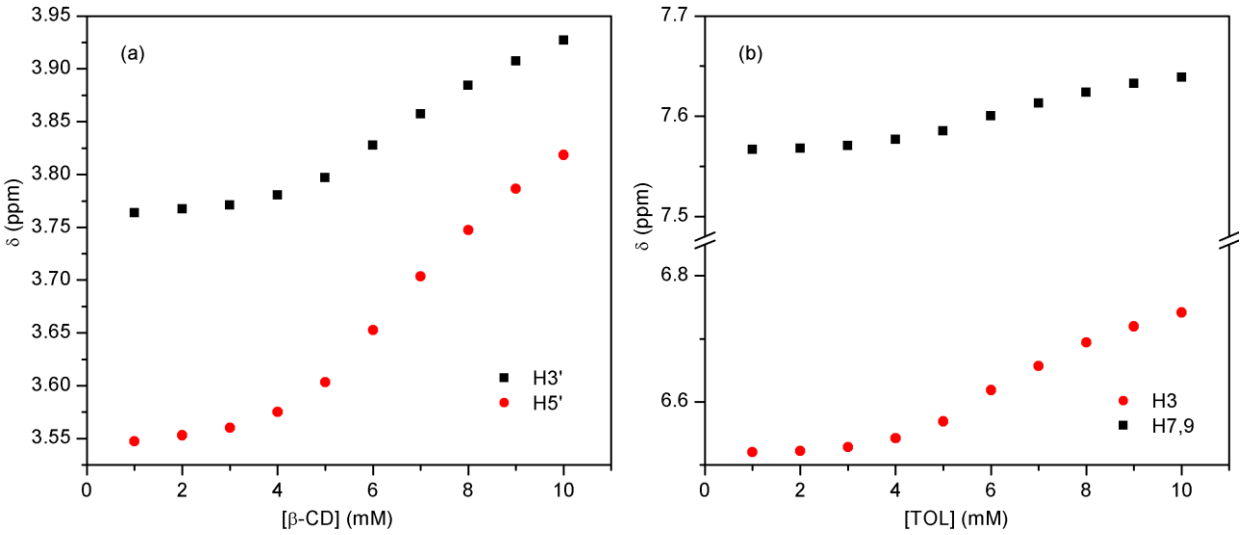

Fig.2 Variatia deplasarii chimice pentru anumiti protoni ai (a) β-CD si (b) TOL

Aceasta variatie observata a deplasarilor chimice ne permite sa utilizam metoda variatiei continue in vederea determinarii stoichiometriei complexului de incluziune format. In cazul nostru, metoda variatiei continer se bazeaza pe variatia indusa a deplasarilor chimice, $\Delta\delta = \delta_f - \delta_{obs}$, care este direct legata de concentratia complexului de incluziune format. Astfel daca o marime fizica ce contine $\Delta\delta$, este reprezentatain functie de fractia molara a moleculei gazda sau oaspete *r*, (grafic Job), valoarea maxima va apare la r_{TOL} = m/(m+n) sau $r_{\beta\text{-CD}}$ = n/(m+n), unde *m* si *n* sunt rapoartele molare ale tolmetinului, respectiv ale β-CD in complexul format. In cazul prezentei unui schimb chimic rapid, pentru un semnal RMN ce apartine de exemplu tolfenamicului, valoarea calculata $\Delta\delta$ [TOL] va fi proportionala cu concentratia complexului si poate fi reprezentata functie de r_{TOL} [10]. Aceasta metoda a fost aplicata pentru protoni ce apartin atat moleculelor oaspete cat si gazda, furnizind rezultate identice. In acest sens pentru conciziune, in Fig.3 am reprezentat doar graficele Job pentru cei mai afectati protoni.

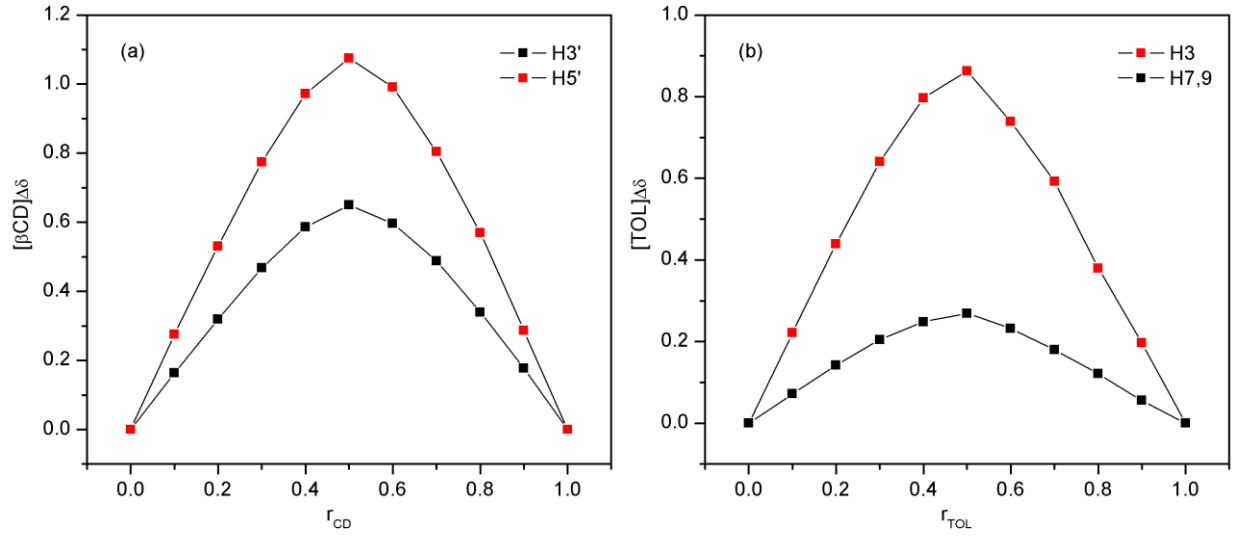

Fig.3 Grafice Job corespunzatoare variatiei chimice induse pentru anumiti protoni ai (a) β-CD si (b) TOL, pentru sistemul β-CD-TOL.

In toate cazurile graficele Job sunt simetrice si prezinta un maxim la *r* = 0.5, indicand astfel existenta unui complex de incluziune cu stoichiometria 1:1, pe domeniul investigat de concentratii. In vederea determinarii gradului de interactiune intermoleculara dintre tolmetin si β-CD, av evaluat valoarea constantei de asociere. Constanta de asociere, K_a in cazul unui complex de incluziune avand stoichiometria 1:1, a fost evaluata printr-o fitare neliniara a variatiei observate a deplasarilor chimice ale semnalelor RMN ale TOL si β-CD in functie de concentratia lor, conform ecuatiei [11]:

$$\Delta\delta^{(i,j)} = \frac{\Delta\delta_c^{(j)}}{2[X]_t^{(i)}}\left\{[G]_t^{(i)} + [H]_t^{(i)} + \frac{1}{K_a} - \left[\left([G]_t^{(i)} + [H]_t^{(i)} + \frac{1}{K_a}\right)^2 - 4[H]_t^{(i)}[G]_t^{(i)}\right]^{1/2}\right\} \quad (18)$$

unde *i* specifica numarul probei si *j* pe cel al protonului investigat. Daca protonul investigat apartine moleculei oaspete sau gazda, atunci X = G respectiv H. $\Delta\delta_c^{(j)}$ reprezinta diferenta de deplasare chimica (a protonul *j*) dintre componentul liber si complexul pur de incluziune. In vederea efectuarii fitarilor, am dezvoltat un program de calcul [12], bazat pe un procedeu iterativ in vederea fitarii datelor experimentale de $\Delta\delta^{(i,j)}$ cu ec.(18). Fiecare pas de iteratie implica o functie quadratica in vederea determinarii directiei de evolutie a fitarii si calculeaza functia de eroare E, definita ca:

$$E = \sum_{i,j}(\Delta\delta^{(i,j)} - \Delta\delta_{calc}^{(i,j)})^2 \quad (19)$$

Procedura de fitare atinge convergenta cand diferenta dintre doua valori E consecutive este mai mica decat 10^{-6}. Tratarea intregului set de protoni investigati genereaza o singura valoare K_a caracteristica intregului proces si un set de valori calculate $\Delta\delta_c^{(j)}$. Programul este flexibil astfel incat pot fi investigate in cadrul procesului de fitare perturbatiile spectroscopice a pina la 15 protoni apartinand atit moleculelor oaspete cat si a celei gazda. In cazul nostru ec. (18) s-a aplicat setului de protoni H(3') si H(5') ai β-CD, respectiv H(3),H(1) si H(7,9) ai tolmetinului. Constanta de asociere obtinuta pe baza procedeului anterior are valoarea K_a = 2164,5 M^{-1}, functia de eroare avand valoarea E= $3{,}06\cdot10^{-4}$ iar factorul de corelare este R = 0,9992. Valorile calculate ale diferentelor de deplasare chimica $\Delta\delta_c$ dintre protonii moleculei libere si a celei implicate in complexul de incluziune sunt:

$$\Delta\delta_c H(3) = 0.2328\,ppm \qquad \Delta\delta_c H(1) = -0.1073\,ppm \qquad \Delta\delta_c H(7,9) = 0.0741\,ppm$$

$$\Delta\delta_c H(3') = 0.1734\,ppm \qquad \Delta\delta_c H(5') = 0.2877\,ppm$$

In vederea obtinerii de informatii privind modul de complexare prin incluziune, s-a inregistrat un spectru 2D ROESY. O zona expandata a spectrului ROESY pentru complexul TOL – β-CD este prezentata in Fig. 4. Acest spectru permite stabilirea proximitatii spatiale dintre protonii apartinind tolmetinului si protoni ai β-CD situati in interiorul cavitatii. Astfel spectrul prezinta „cross-peaks" intense intreprotonii H(3'), H(5') si H(6') ai β-CD si protonii H(7,9), H(8,10) si H(4) ai tolmetinului. Un cross-peak mai putin intens a fost observat intre protonul H(3') al β-CD si protonul H(4) al TOL. Aceste rezultate sugereaza ca TOL prefera sa penetreze in cavitatea β-CD prin intrarea mai larga , prima data cu gruparea tolyl si atia ringul tolyl si gruparea pirol sunt localizate in interiorul cavitatii. Rezultatele obtinute in acest studiu privind stabilitatea complexului format precum si modalitatea de complexare sunt intr-o excelenta

concordanta cu cele obtinute de Junquera [13], care a realizat un studiu bazat pe masuratori conductometrice si modelare moleculara.

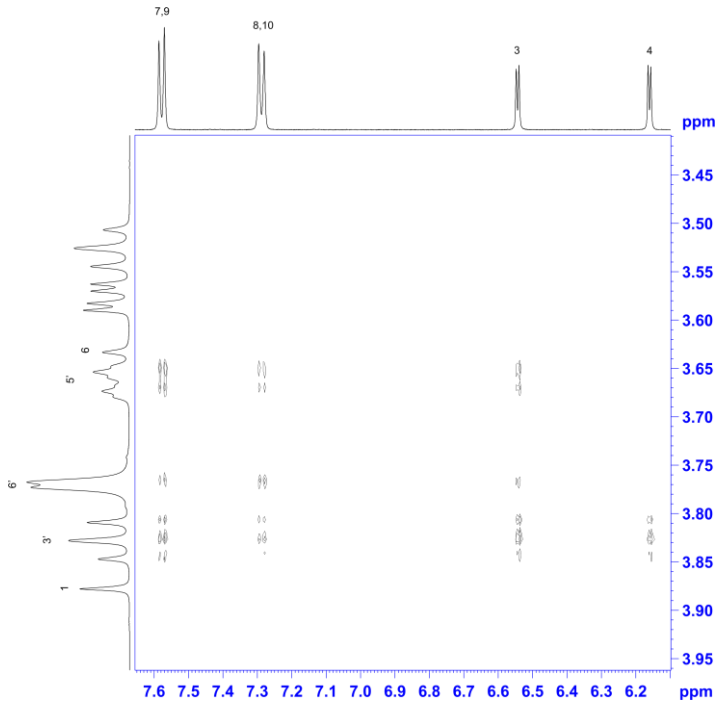

Fig.4 Regiunea extinsa a spectrului ROESY a complexului TOL - β-CD

2.4 Influenta HSA asupra formarii complexului de incluziune TOL - β-CD

In vederea elucidarii rolului jucat de HSA in cadrul procesului de complexare al TOL cu β-CD am aplicat procedura de titrare RMN pentru doua seturi de probe in care concentratia de albumina serica umana a fost mentinuta constanta la 4μM, respectiv 10μM. In vederea determinarii constantei de asociere K_a a complexului TOL-β-CD, concentratia de tolmetin a fost mentinuta constanta la 1mM, iar rezonantele protonilor apartinand TOL au fost monitorizate in functie de concentratia de β-CD. Spre exemplificare, variatia $\Delta\delta_{obs} = \delta_{free} - \delta_{obs}$ in functie de concentratia de β-CD pentru cei mai reprezentativi protoni ai TOL este prezentata in Fig. 5 pentru cazul [HSA] = 10μM.

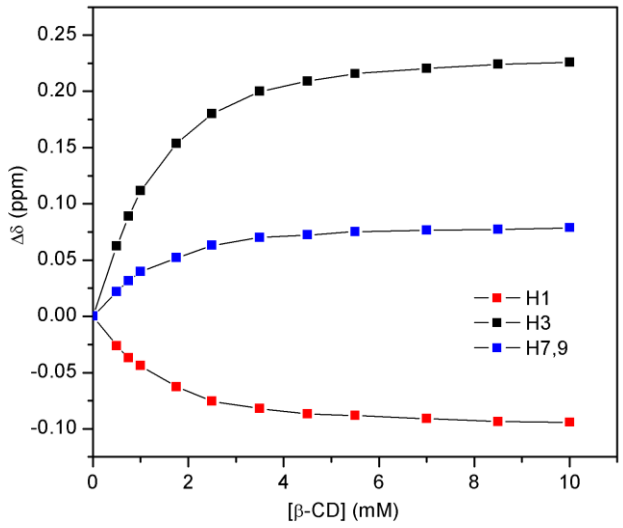

Fig.5 Variatia deplasarii chimice pentru unii protoni ai TOL in functie de concentratia de β-CD pentru [HSA] = 10 μM.

Datele experimentale prezentate in Fi.5 au fost fitate cu ec.(17) in ipoteza in care complexul de incluziune care se formeaza are stoichiometria 1:1. In cadrul ec.(17) apare termenul Q definit in ec.(10). In vederea calcularii acestui parametru am utilizat valorile $[P]_t$ = 10μM si $[L]_t$ = 1mM. Constanta de disociere $K_d(1)$ a complexului HSA-TOL utilizata, a fost cea determinata de Bai [14] prin relaxometrie RMN si anume $K_d(1)$ = 1.75mM. Mentionam ca aceasta valoare a fost obtinuta in prezenta in exces a tolmetinului fata de HSA si anume : [HSA] = 0.2mM iar [TOL] variaza intre 4 si 24 mM. In cazul nostru rezulta ca parametrul Q = 0,996 mM, o valoare foarte apropiata de valoarea utilizata in cadrul experimentulu pentru tolmetin (1mM). Parametri de fit $K_d(2)$si $\Delta\delta_c$ obtinuti in prezenta HSA sunt sumarizati in Tabelul 1.

Tabel 1. Parametri $K_a = 1/K_d$ si $\Delta\delta_c$ ce caracterizeaza complexul TOL-β-CD in prezenta HSA

[HSA] (μM)	**K_a** ($10^3 Lmol^{-1}$)	**$\Delta\delta_c$ H(3)** (ppm)	**$\Delta\delta_c$ H(1)** (ppm)	**$\Delta\delta_c$ H(7,9)** (ppm)	**E(10^{-4})**	**R**
4	2.033	0.2494	- 0.1001	0.0884	0.294	0.9999
10	1.493	0.2466	- 0.1016	0.0853	0.477	0.9995

Analiza rezultatelor obtinute ne permit sa concluzionam ca adaugarea de HSA in solutie, slabeste taria interactiunii TOL cu β-CD dar nu afecteaza stoichiometria complexului de incluziune sau modul de legare. Rezultatul obtinut poate fi cauzat de catre absorbtia unor molecule de TOL pe HSA, cauzand astfel o descrestere atat a mobilitatii acestora cat si a concentratiei moleculelor libere de tolmetin disponibile a se complexa cu β-CD.

2.5 Legarea complexului TOL-β-CD de HSA

Intr-un studiu precedent [15], interactiunea TOL cu HSA a fost investigata prin intermediul spectroscopiei de fluorescenta si de absorbtie UV-vis la diferite temperaturi, combinata cu masuratori de flurescenta rezolvata in timp. Utilizand metode variatiei continue, s-a pus in evidenta o singura clasa dea pozitiilor de legare a TOL de HSA si s-a calculat constanta de asociere K_a la diverse temperaturi. De asemenea, dupa cum s-a demonstrat in sectiunea anterioara, moleculele de TOL sunt capabile sa formeze complecsi de incluziune cu β-CD, complecsi caracterizati de o constanta de asociere smnificativa ca valoare. Acest proces de incapsulare poate modula interactiunea de legare HSA-TOL , deoarece moleculele de β-CD actioneaza ca o teaca care acopera moleculele de TOL, prevenind astfel legarea lor libera de HSA. In vederea clarificarii rolului β-CD in procesul de interactiune TOL-HSA, am inregistrat spectrele de fluorescenta ale HSA pentru trei concentratii crescatoare de β-CD. Spre exemplificare, in Fig.6 sunt prezentate spectrele de fluorescenta ale HSA, functie de concentratia de TOL, in prezenta a 0,35mM de β-CD. Aceste spectre de fluorescenta ilustreaza faptul ca moleculele de TOL cauzeaza “inghetarea” fluorescentei HSA. Inghetarea fluorescentei HSA poate fi atribuita unor mecanisme diverse ce includ rearanjari moleculare, transfer de energie, formare de complecsi in starea fundamentala sau inghetare colisionala [16].

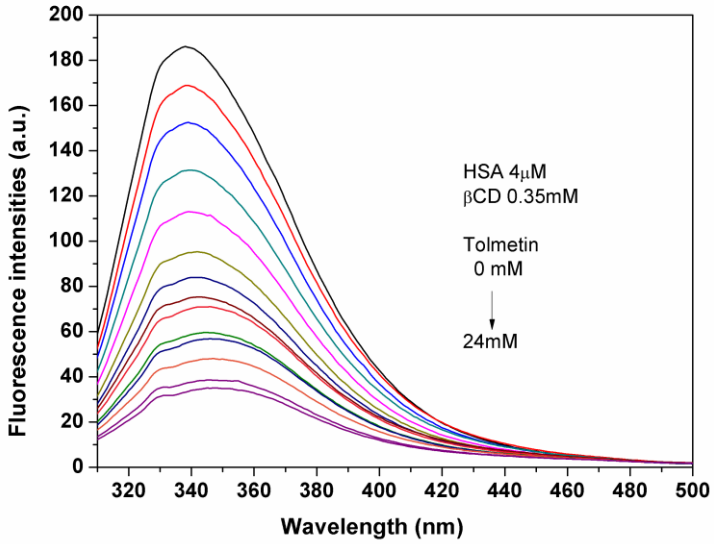

Fig.6 Spectrele de fluorescenta ale HSA in prezenta a 0,35mM de β-CD, pentru concentratii de TOL cuprinse intre 0 si 24μM

Procesul de inghetare al fluorescentei este descris in mod uzual prin intermediul ecuatiei Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \qquad (20)$$

unde F_0 si F reprezinta intensitatile fluorescentei in absenta si in prezenta agentului ce provoaca fenomenul de inghetare (TOL), [Q] este concentratia acestui agent iar K_{SV} este constanta Stern-Volmer ce caracterizeaza acest proces. Graficele Stern- Volmer, pentru procesele observate de ingetare a fluorescentei sunt liniare si sunt reprezentate in Fig. 7

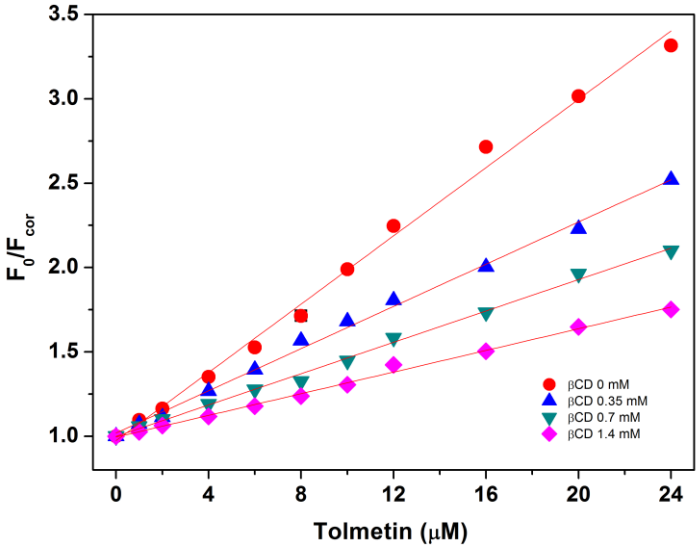

Fig.7 Grafice Stern-Volmer caracteristice procesului de inghetate a fluorescentei HSA de catre TOL, pentru concentratii deTOL cuprinse intre 0 si 24μM

Dupa cum se poate observa, toate sistemele ternare investigate prezinta aceiasi dependenta liniara Stern-Volmer ca si sistemul HSA-TOL, dar cu un proces de inghetare mai slab in comparatie cu observat in cazul absentei β-CD. Acest fapt sugereaza ca adaugarea a diferite cantitati de β-CD nu influenteaza mecanismul de inghetare caracteristic procesului de interactiune TOL-HSA. Valorile constantelor K_{SV} ce caracterizeaza interactiunea TOL-HSA in absenta respectiv prezenta diferitelor concentratii de β-CD s-au determinat pe baza unor regresii liniare ale graficelor F_0/F functie de [TOL], iar rezultatele obtinute sunt prezentate in Tabelul 2.

Tabel 2. Constantele Stern-Volmer, caracteristice legarii HSA-TOL, in absenta respectiv prezenta β-CD

[HSA] (μM)	**[β-CD]** (mM)	**K_{SV}** (10^4 $Lmol^{-1}$)	**S.D.**[a]	**R**[b]
4	0.00	10.1	0.25	0.993
	0.35	6.2	0.12	0.996
	0.70	4.6	0.09	0.996
	1.40	3.2	0.69	0.995

[a] S.D. este deviatia standard; [b] R este factorul de corelare

Aceste valori sunt mai mici decat cele observate in cazul legarii TOL-HSA in absenta β-CD. Acest rezultat confirma faptul ca β-CD impiedica procesul de ciocnire al moleculelor de TOL cu cele de HSA datorita formarii complexului de incluziune TOL-β-CD. In vederea determinarii constantelor de legare K_a ce caracterizeaza procesul de legare al TOL de HSA, in absenta respectiv prezenta β-CD, am utilizat cea mai generala ecuatie valida pentru a analiza modificarile intensitatilor de fluorescenta cauzate de formarea unui complex 1:1. Aceasta ecuatie, in versiunea ei normalizata, poate fi exprimata sub forma:

$$\frac{F_{corr}}{F_0} = 1 + \left(\frac{F_c}{F_0} - 1\right)\frac{[P]_t + [Q]_a + K_d - \sqrt{([P]_t + [Q]_a + K_d)^2 - 4[P]_t[Q]_a}}{2[P]_t} \qquad (21)$$

unde F_{corr} reprezinta fluorescenta masurata, corectata pentru efectul de filtru intern, F_0 este fluorescenta observata in absenta tolmetinului, F_c este fluorescenta reziduala a HSA complet complexata, K_d este constanta de disociere, $[P]_t$ este concentratia de HSA iar [Q] este concentratia tolmetinului adaugat.

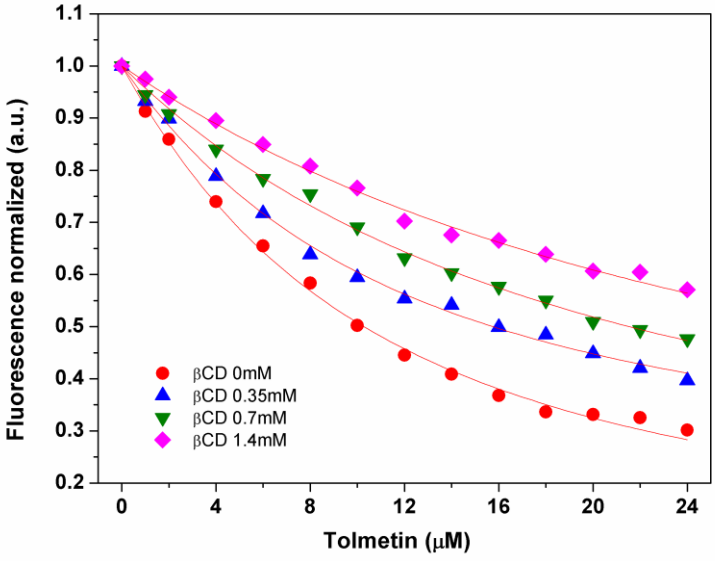

Fig.8 Fluorescenta normalizata a HSA functie de [TOL], in absenta ,respectiv prezenta β-CD

Valorile K_d si F_c s-au obtinut in absenta si in prezenta unor concentratii diferite de β-CD (Fig.8) prin fitarea datelor experimentale cu ec. (21). Rezultatele obtinute sunt prezentate in Tabel 3. Se observa ca nu avem practic fluorescenta reziduala, interactiunea dintre HSA si TOL este mai slaba in prezenta β-CD iar $K_a = 1/K_d$ descreste odata cu cresterea concentratiei de β-CD. Pe baza rezultatelor obtinute putem concluziona ca prezenta unor cantitati mici de β-CD in solutie sunt foarte eficiente in a impiedica irealizarea interactiunii specifice TOL-HSA. Aceasta comportare este similara cu cea rezultate in urma altor studii de acest tip [1-3}.

Tabel 3. Parametri de legare TOL-HSA in absenta si in prezenta unor concentratii diferite de de β-CD

Sistem	**[β-CD]** (mM)	**F_c** (a.u)	**K_a** (10^5 $Lmol^{-1}$)	**R**
HSA - TOL	0.00	0.0056	1.223	0.9977
	0.35	0.1527	1.075	0.9949
	0.70	0.0503	0.572	0.9965
	1.40	0.0213	0.361	0.9953

2.6 Investigare conformationala

Spectrele de fluorescenta sincrona pot furniza informatii cu privire la cadrul molecular din vecinatatea moleculelor cromofore ale HSA. Spectrele defluorescenta sincrona ale HSA furnizeaza informatii privind vecinatatea din apropierea tirosinei (Tyr) si cea a triptofanului (Trp) cand $\Delta\lambda$ = 15 nm respectiv 60 nm. $\Delta\lambda$ reprezinta diferenta dintre lungimea de unda de excitatie (λ_{exc}) si cea de emisie (λ_{em}). Efectele produse de TOL, respectiv TOL/β-CD asupra fluorescentei sincrone a HSA sunt prezentate in Fig.9

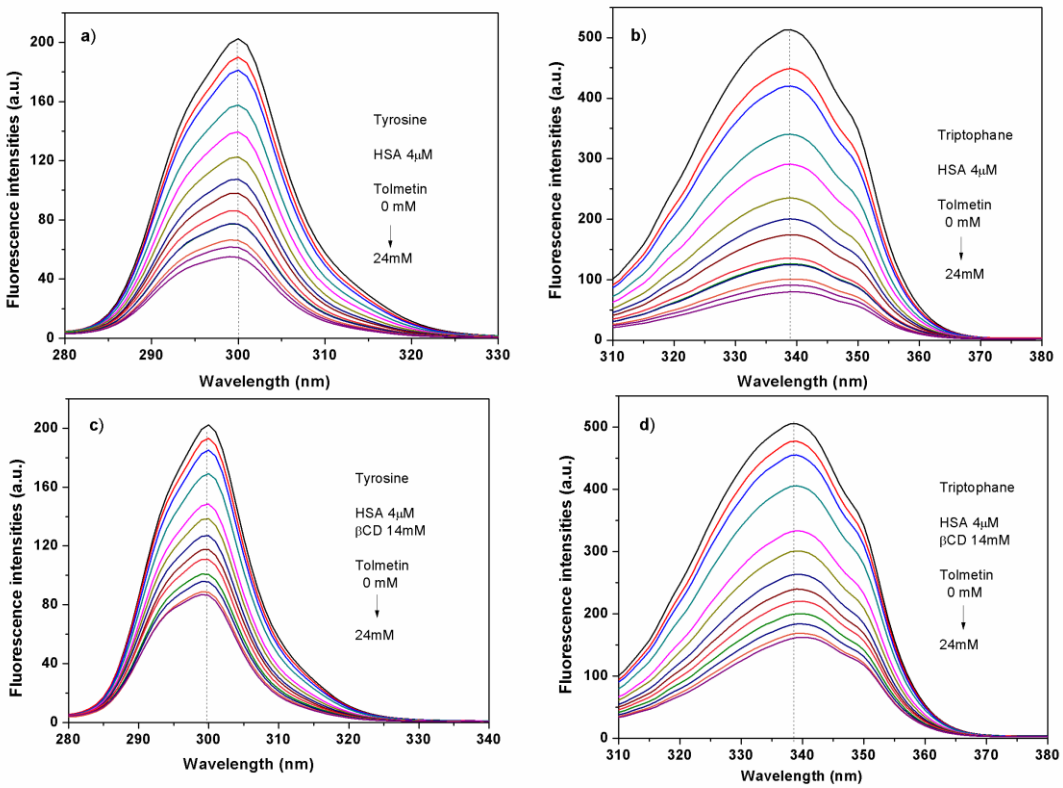

Fig.9 Spectrele de dfluorescenta sincrona ale HSA pentru diferite concwentratii de TOL ($\Delta\lambda$ = 15nm (a) si $\Delta\lambda$ = 60 nm (b)) respectiv ($\Delta\lambda$ = 15nm (a) si $\Delta\lambda$ = 60 nm (b)) ($\Delta\lambda$ = 15nm (c) si $\Delta\lambda$ = 60 nm (d))

Dupa cum rezulta din analiza spectrelor de fluorexcena sincrona, atat TOL cat si TOL/β-CD cauzeaza descresterea intensitatii de fluorescenta dar nu deplaseaza pozitia maximului de emisie al HSA. Acest rezultat constitue un indiciu al nemodificarii conformatiei moleculare a HSA in vecinatatea reziduurilor de Tyr si TRp.

Concluzii

Procesul de incluziune al tolmetinului in cavitatea hidrofoba a β-CD a fost investigata prin intermediul spectroscopiei 1D si 2D RMN. Stoichiometria complexului de incluziune este de 1:1 iar constanta d asociere are valoarea K_a = 2164,5 M^{-1}. Structura complexului de incluziune a fost propusa pe baza informatilor furnizate de spectrul ROESY NMR. Astfel s-a concluzionat ca molecula de tolmetin penetreaza cavitatea β-CD prin zona gruparilor hidroxil secundare, prima data cu gruparea tolyl. Din analiza spectrului ROESY, rezulta ca atat gruparile olyl cat si pirol sunt localizate in interiorul cavitatii. Experimentele de titrare a tolmetinului cu β-CD in prezenta albuminei serice umane au aratat ca adaugarea de HSA produce o micsorare a tariei legarii TOL de β-CD. Acest efect poate fi cauzat de catre absorbtia unor molecule de tolmetin pe albumina serica umana, reducandu-se astfel concentratia tolmetinului aflat in stare libera in solutie. Legarea tolmetinului de HSA in absenta , respectiv prezenta moleculelor de β-CD a fost studiata prin intermediul spectroscopuiei de fluorescenta. Analiza rezultatelor obtinute ne-au permis sa concluzionam ca adaugarea de β-CD slabeste procesul de inghetare si de legare al TOL de HSA dar nu modifica conformatia moleculara a HSA in zona reziduurilor de Tyr si Trp. Aceste rezultate indica faptul ca procesul competitiv dintre β-CD si HSA la legarea tolmetinului poate modula concentratia de tolmetin aflat in stare libera in solutie, avand astfel un impact major asupra biodisponibilitatii acestuia.

Bibliografie

[1] Natesan, S., Sowrirajan, C., Dhanaraj, P., Enoch, I.V.M.V.: Capping of silybin with cyclodextrin influences its binding with bovine serum albumin. A study of fluorescence spectroscopy and molecular modeling. Bull. Korean Chem. Soc. **35** 2114- 2122 (2014)

[2] Natesan, S., Sowrirajan, C., Yousuf,.S., Enoch, I.V.M.V.: Mode of encapsulation of Linezolid by β–cyclodextrin and its role in bovine serum albumin binding. Carbohydrate Polymers. **115,** 589 – 597 (2015)

[3] Yan, J., Wu, D., Ma, X., Wang, L., Xu, K., Li, H.: Spectral and molecular modeling studies on the influence of β–cyclodextrin and its derivatives on aripiprazole-human serum albumin binding. Carbohydrate Polymers, **131,** 65 – 74 (2015)

[4] Redondo, J., Capdevila,A., Latorre, I.: Host-guest complexation of omeprazole, pantoprazole and rabeprazole sodium salts with cyclodextrins: an NMR study on solution structures and enantiodiscrimination power. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, **73,** 225 – 236 (2012)

[5] Floare,C.G., Pirnau, A., Bogdan, M.: ^{1}H NMR spectroscopic characterization of inclusion complexes of tolfenamic and flufenamic acids with β-cyclodextrin. J. Molec. Structure, **1044**, 72-78 (2013)

[6] Medronho, B., Valente, A.J.M., Costa, P.: Inclusion complexes of rosmarinic acid and cyclodextrins: stoichiometry, association constants, and antioxidant potential. Colloid Polym. Sci, **292,** 885-894 (2014)

[7] Pirnau, A., Floare, C.G., Bogdan, M.: The complexation of flurbiprofen with β-cyclodextrin: a NMR study in aqueous solution. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, **78,** (2014) 113-120 (2014)

[8] Martinez-Alonso,A., Losada-Barreiro, S., Bravo-Diaz, C.: Encapsulation and solubilization of the antioxidants gallic acid and ethyl, propyl and butyl gallate with β-cyclodextrin. J. Molec. Liquids, **210,** 143-150 (2015)

[9] Neamtu, S., Mic, M., Bogdan, M., Turcu, I.: The artifactual nature of stavudine binding to human serum albumin. A fluorescence quenching and isothermal titration calorimetry study. J. Pharm. Biomed. Anal, **72,** 2134-138 (2013)

[10] Djedaïne, F., Lin, S.Z., Perly, B., Wouessidjewe, D.: High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a β-cyclodextrin:indomethacin inclusion complex. J. Pharm. Sci **79,** 643-646 (1990)

[11] Bogdan, M., Caira, M.R., Farcas, S.I.: Inclusion of the niflumic acid anion in β-cyclodextrin: A Solution NMR and X-ray structural investigation. Supramol. Chem. **14,** 427-435 (2002)

[12] Floare, C.G. Bogdan, M.: CONSTEQ – a program for association constants determination using solution NMR data. AIP Conf. Proc. **1565,** 48-52 (2013)

[13] Junquera, E., Mendicuti, F., Aicart, E.:Driving forces for the inclusion of the drug tolmetin by β-cyclodextrin in aqueous medium. Conductometric and molecular modeling studies. Langmuir **15,** (1999) 4472-4479 (1999)

[14] Bai, G., Cui, Y., Yang, Y., Ye, C., Liu, M., Acompetitive low-affinity binding model for determining the mutual and specific sites of two ligands on protein, J. Pharm. Biomed. Anal. **38,** 588-593 (2005)

[15] Neamtu, S., Tosa, N., Bogdan, M.: Spectroscopic investigation of tolmetin interaction with human serum albumin. J. Pharm. Biomed. Anal. **85,** 277-282 (2013)

[16] M. van de Weert, M., Stella, L.:Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology. J. Molec. Struc. **993,** 144-150 (2011)

Director proiect,