

Agnieszka Szkuclarek

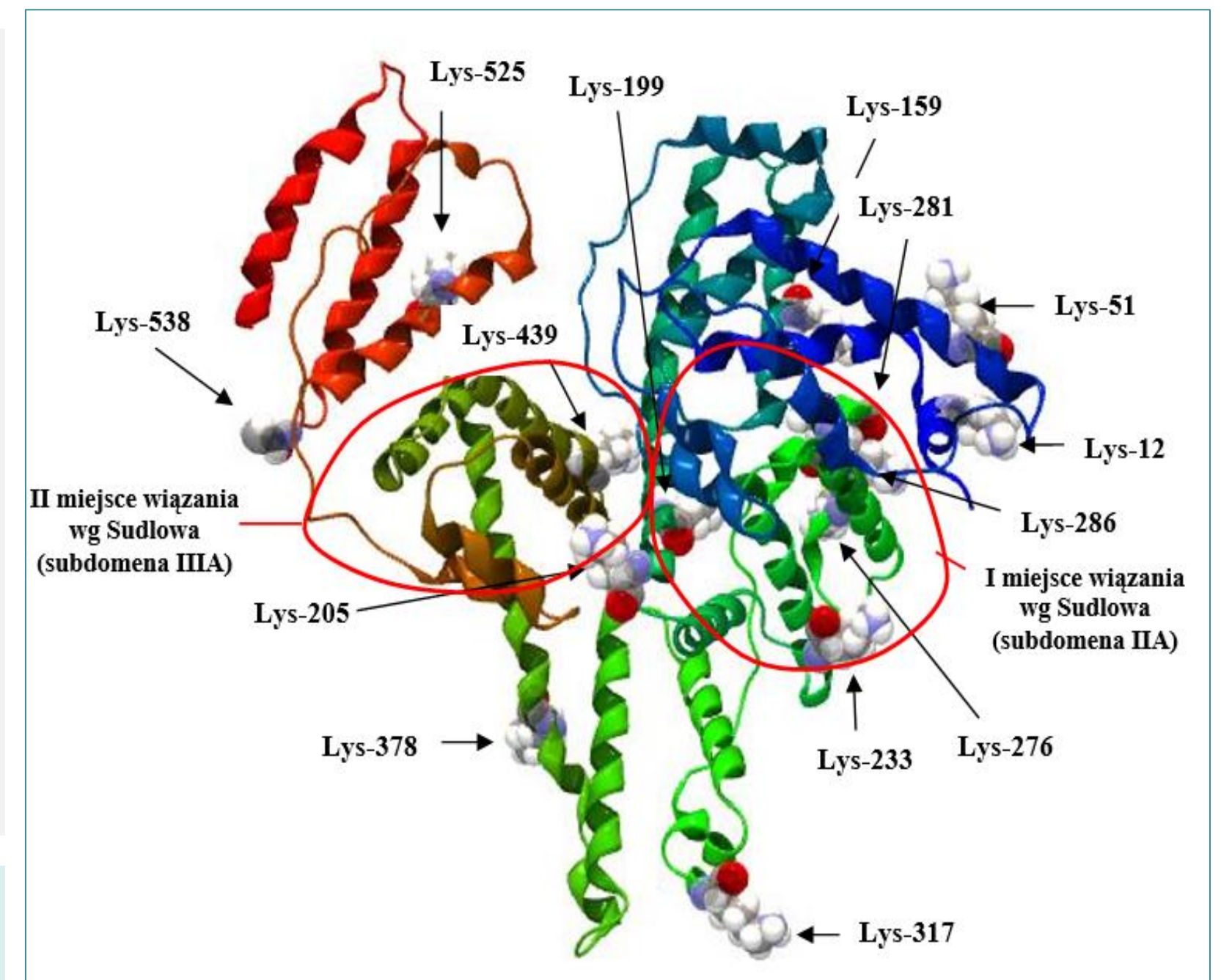
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, aszkuclarek@sum.edu.pl

Albumina surowicy krwi ludzkiej (ang. *Human Serum Albumin*, HSA) stanowi główne białko transportujące wiele egzo- i endogennych, biologicznie czynnych związków, w tym kwasów tłuszczowych i leków. Struktura HSA bezpośrednio koreluje z kluczowymi funkcjami, jakie pełni ona w utrzymaniu homeostazy ustroju, które mogą ulec zaburzeniu na skutek modyfikacji powodowanych m.in. glikacją (Ryc.1). Końcowym produktem glikacji białek jest heterogenna grupa związków (ang. *Advanced Glycation End-Products*, AGEs) o różnorodnych właściwościach fizykochemicznych, które biorą udział w patogenezie wielu schorzeń przewlekłych, czy też procesów degeneracyjnych związanych z wiekiem.

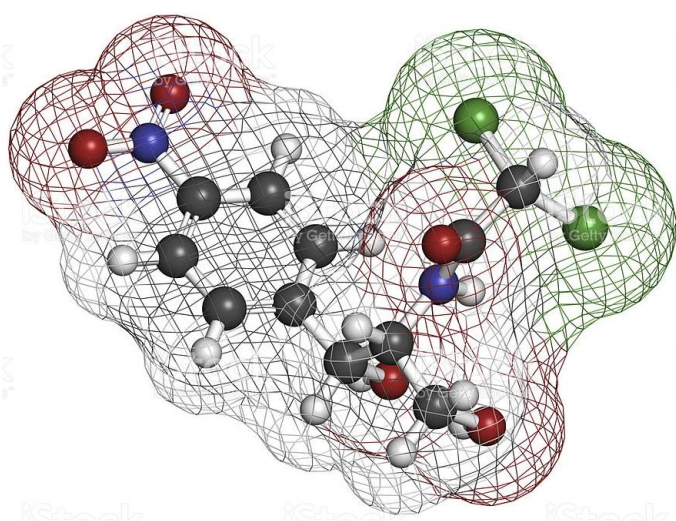
Oddziaływanie leków z białkiem transportującym stanowi ważny element terapii, ponieważ albumina wpływa na dystrybucję substancji leczniczej w organizmie, na jej własności farmakokinetyczne i farmakodynamiczne.

Chloramfenikol (ang. *Chloramphenicol*, CAP, Ryc.2) jest jednym z najstarszych chemioterapeutyków działającym bakteriostatycznie wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. CAP należy do antybiotyków toksycznych, wobec czego jego stosowanie jest ograniczone do leczenia poważnych infekcji, w tym gorączki tyfusowej i innych zagrażających życiu zakażeń ośrodkowego układu nerwowego i dróg oddechowych.

Celem pracy była analiza oddziaływania chloramfenikolu (CAP) z niemodyfikowaną (HSA) i glikowaną glukozą w obecności kwasów tłuszczowych (gHSA_{GLC}) albuminą surowicy krwi ludzkiej oraz miejsca wiązania CAP do albuminy HSA i gHSA_{GLC} z użyciem znaczników fluorescencyjnych odpowiednio II i I miejsca wiążącego wg nomenklatury Sudlowa: kwasu (2-p-toluidyno)naftaleno-6-sulfonowego (TNS) i 5-dimetyloaminonaftaleno-1-sulfonamidu (DNSA)



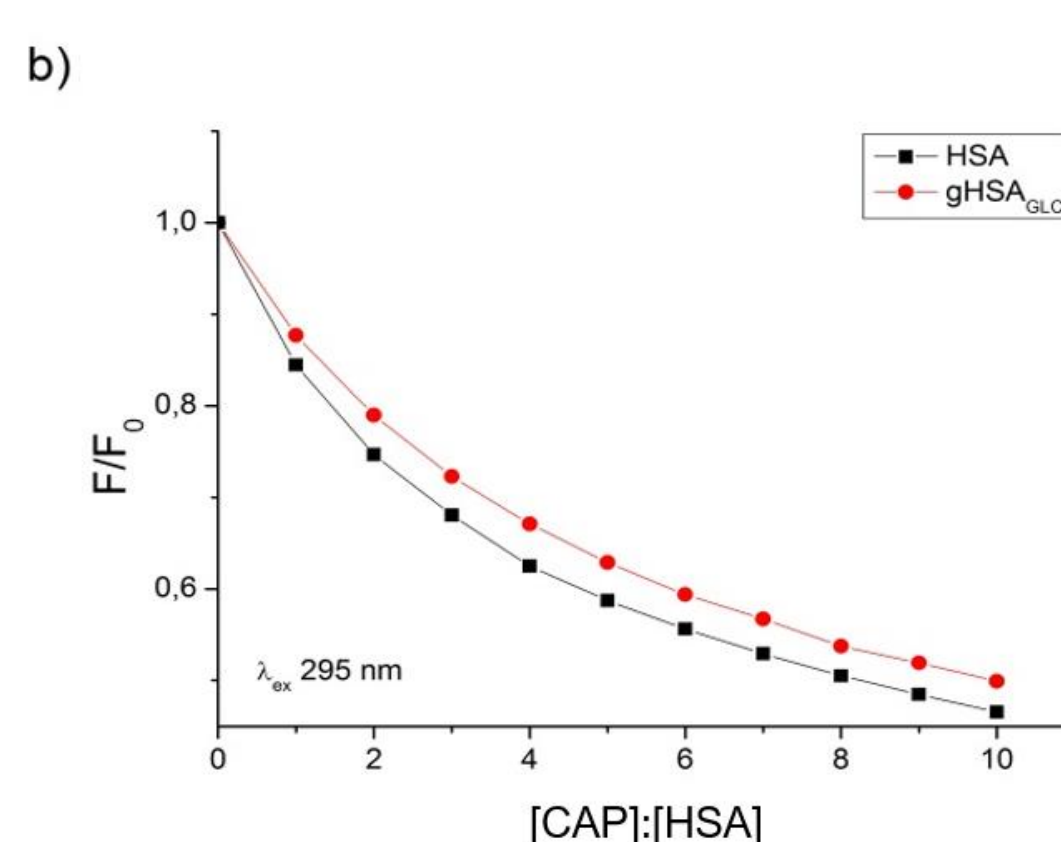
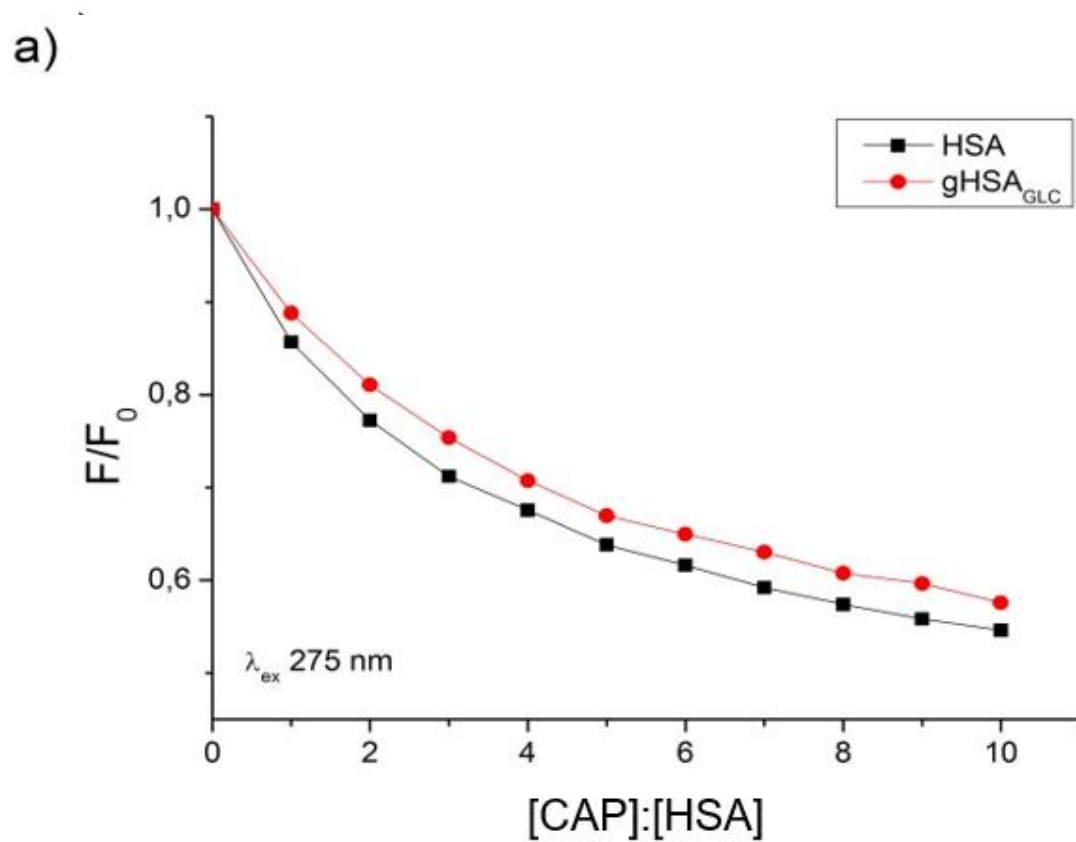
Ryc.1 Trójwymiarowa struktura natywnej albuminy HSA z oznaczeniem głównych miejsc ulegających glikacji



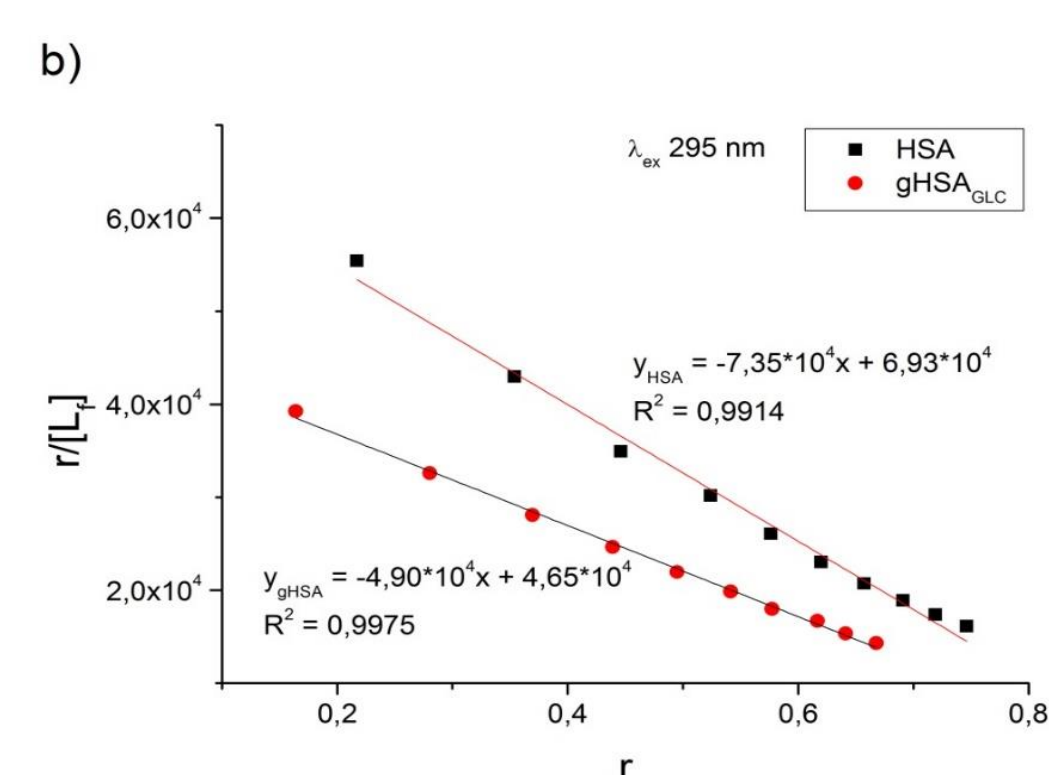
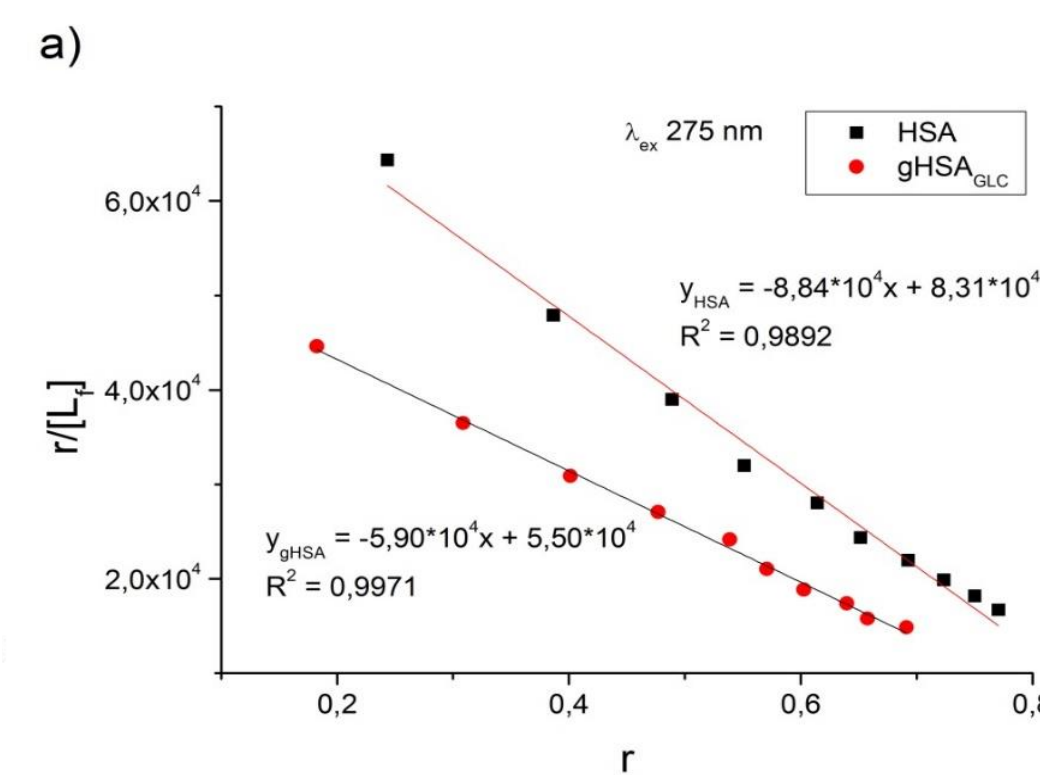
Ryc.2 Struktura chemiczna chloramfenikolu, CAP

MATERIAŁY I METODY

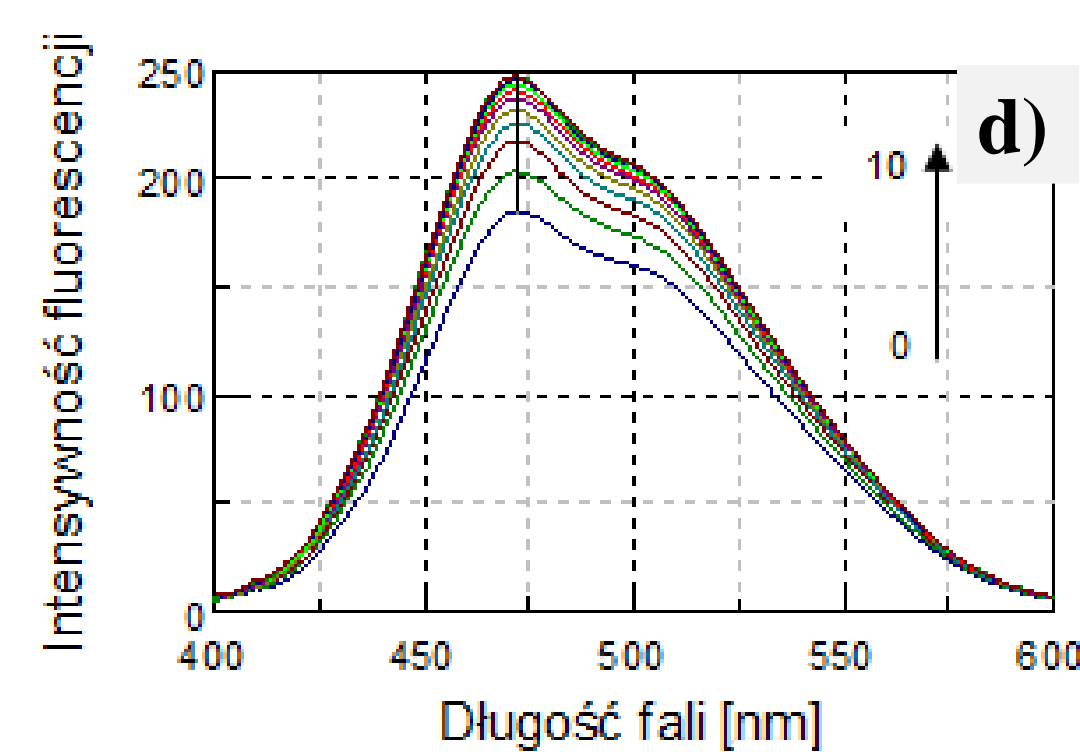
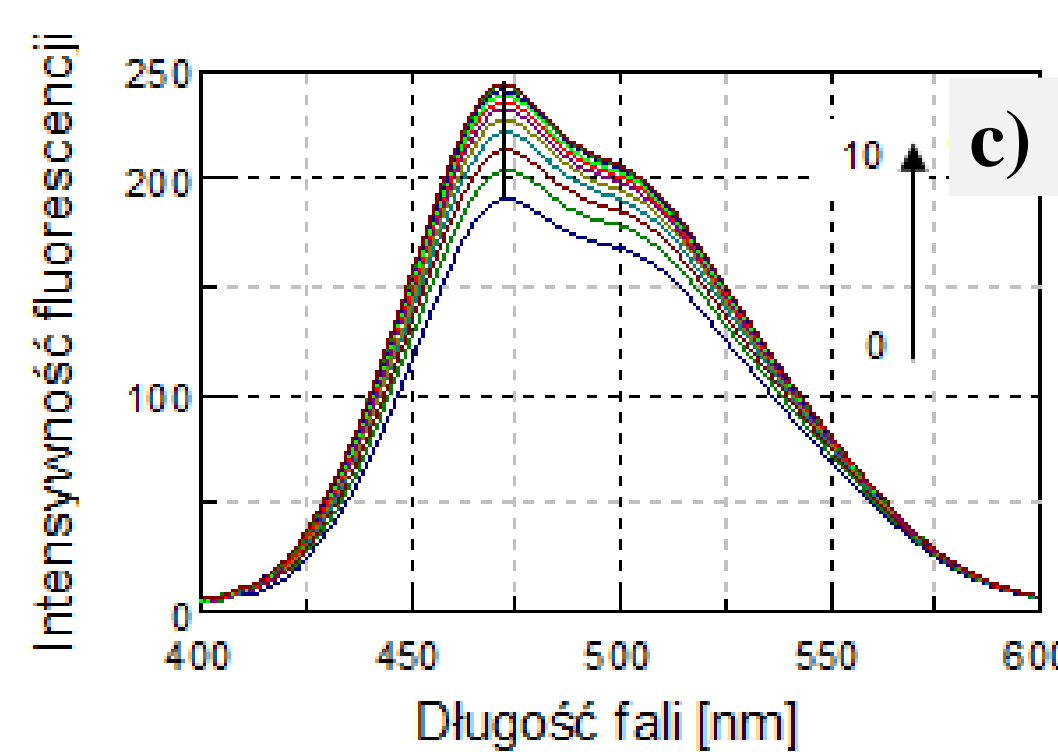
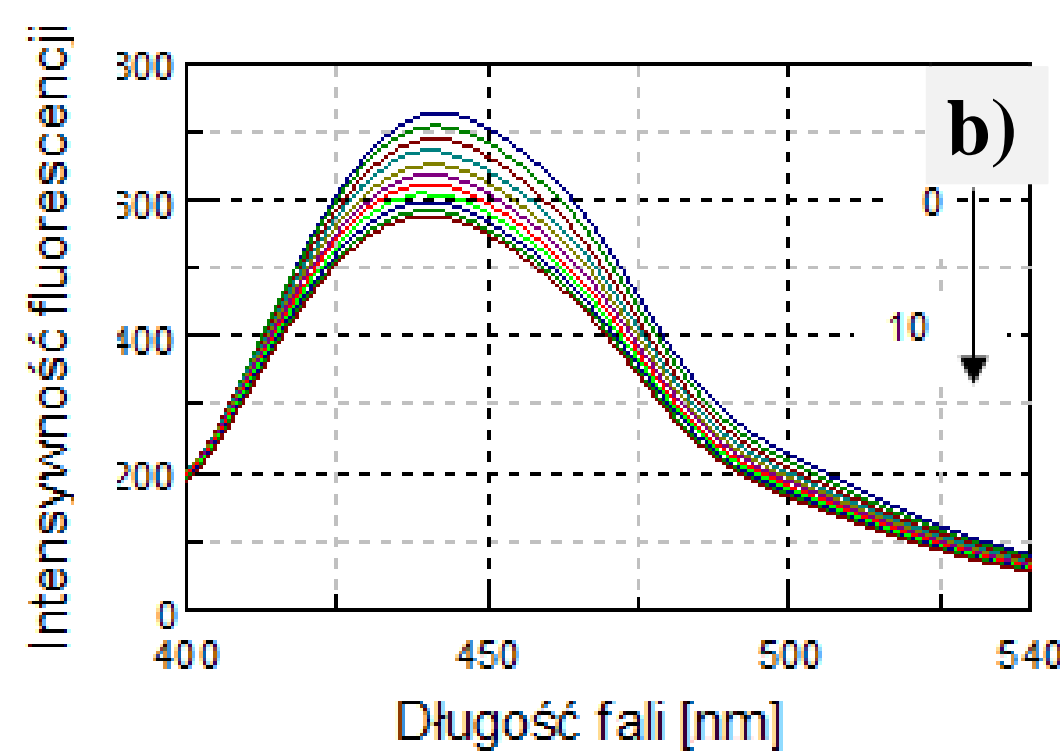
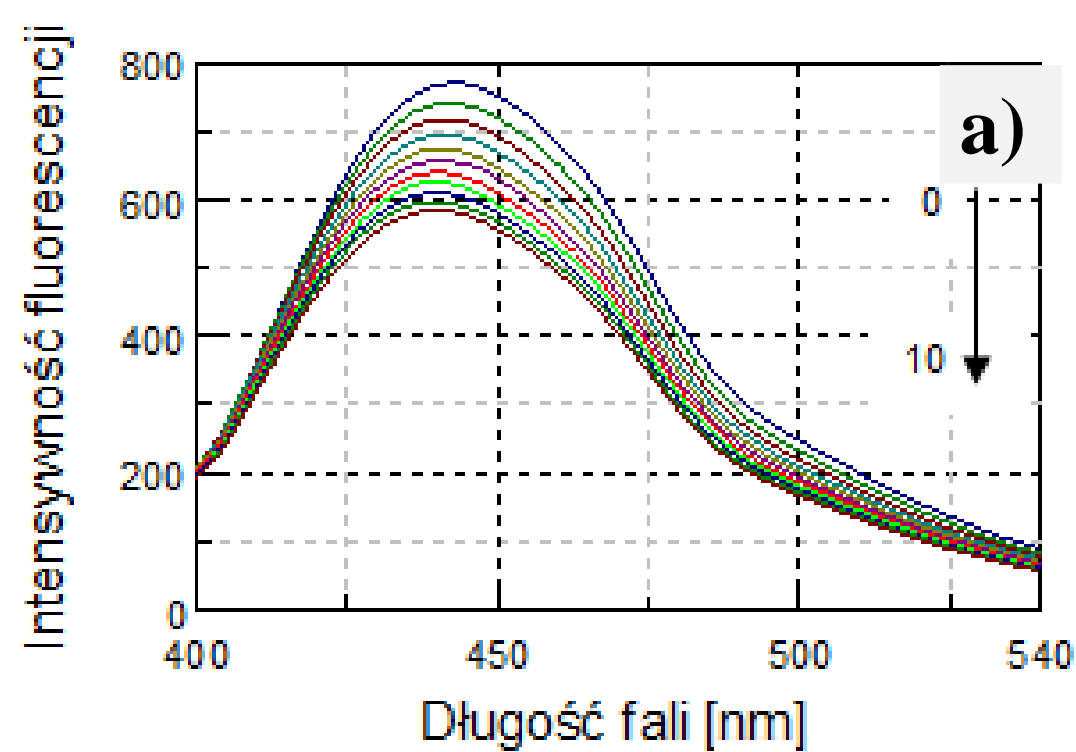
Roztwór HSA i glukozy (GLC) [1.25 M] sporządzono w 0.05 M buforze TRIS-HCl (pH 7.4) z dodatkiem 0.015 M azydru sodu (NaN₃). Przygotowano roztwór HSA o stężeniu 5×10^{-6} M, który stanowił próbę kontrolną oraz roztwór HSA o stężeniu 5×10^{-6} M w obecności glukozy o stężeniu 0.1 M (układ HSA-GLC). Roztwory albumin przepuszczono przez filtry membranowe o średnicy porów 0.2 μ m, a następnie w sterylnie zamkniętych probówkach poddano inkubacji w temperaturze 37°C przez okres 21 dni. Zamieszczone widma zarejestrowano na spektrofluorymetrze JASCO FP-6500 przy użyciu standardowych kuwet kwarcowych. Fluorescencję HSA i gHSA_{GLC}, bez i w obecności CAP wzbudzano promieniowaniem o długości fali λ_{ex} 275 nm i λ_{ex} 295 nm. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 37°C. Użyto następujących parametrów widmowania: szerokość szczeliny wzbudzenia/emisji - 5/5 nm, czas odpowiedzi (response) - 4 s, wzmocnienie sygnału (sensitivity) - „Medium”, szybkość skanowania próbek - 200 nm/min.



Ryc.3 Krzywe wygaszania fluorescencji HSA i gHSA_{GLC} w obecności CAP zarejestrowane dla długości fali wzbudzenia a) λ_{ex} 275 nm, b) λ_{ex} 295 nm



Ryc.4 Krzywe Scatcharda dla HSA i gHSA_{GLC} w obecności chloramfenikolu a) λ_{ex} 275 nm, b) λ_{ex} 295 nm



Ryc.5 Emisyjne widma fluorescencji a) HSA-TNS, b) gHSA_{GLC}-TNS, c) HSA-DNSA, d) gHSA_{GLC}-DNSA, [albumina:znacznik 1:1] [HSA, gHSA_{GLC}] 5×10^{-6} M, [CAP] 5×10^{-6} - 5×10^{-5} M, λ_{ex} 350 nm, $t = 37^\circ$ C

WNIOSKI

- Badania z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych TNS i DNSA wykazały, że CAP silniej wypiera TNS z jego połączeń z albuminą HSA niż gHSA_{GLC}, co świadczy, że chloramfenikol ulega wiązaniu w subdomenie IIIA albuminy HSA i gHSA_{GLC} i silniej wiąże się z HSA niż z gHSA_{GLC}. Wysokie wartości stałych asocjacji K_a i Sterna-Volmera K_{SV} rzędu 10^4 świadczą o wysokim powinowactwie chloramfenikolu do miejsca wiązania w cząsteczce HSA i gHSA_{GLC}
- Wygaszanie fluorescencji HSA i gHSA_{GLC} przez CAP zachodzi na drodze mechanizmu dynamicznego i statycznego
- Przebieg izoterm wiązania wskazuje na model specyficznego i niespecyficznego wiązania w CAP-HSA i CAP-gHSA_{GLC}
- Analiza zależności Scatcharda i Klotza wykazała istnienie jednej klasy równocennych, niezależnych miejsc wiążących chloramfenikol w cząsteczce albuminy niemodyfikowanej i glikowanej (lub jednego miejsca wiązania)
- Na podstawie krzywej Hilla ($n_H = 1$) stwierdzono, że wiązanie CAP z HSA i gHSA_{GLC} jest niekooperatywne

ZMNIJSZENIE FRAKCJI ZWIĄZANEJ CAP W KOMPLEKSIE Z ALBUMINĄ gHSA_{GLC} PROWADZI DO WZROSTU STĘŻENIA LEKU WE KRWI, A W KONSEKWENCJI DO WYSTĄPIENIA EFEKTÓW NIEPOŻĄDANYCH ZAGRAŻAJĄCYCH ŻYCIU PACJENTA. POWODZENIE TERAPII Z UŻYCIEM CAP BĘDZIE WYMAGAŁO INDYWIDUALNIE DOBRANEJ DAWKI FARMACEUTYKU WRAZ Z TERAPIĄ MONITOROWANĄ, CO PRZYCZYNI SIĘ DO UZYSKANIA OCZEKIWANEGO EFEKTU TERAPEUTYCZNEGO, ZWŁASZCZA U OSÓB CIERPIĄCYCH NA CHOROBY PRZEWLEKŁE.