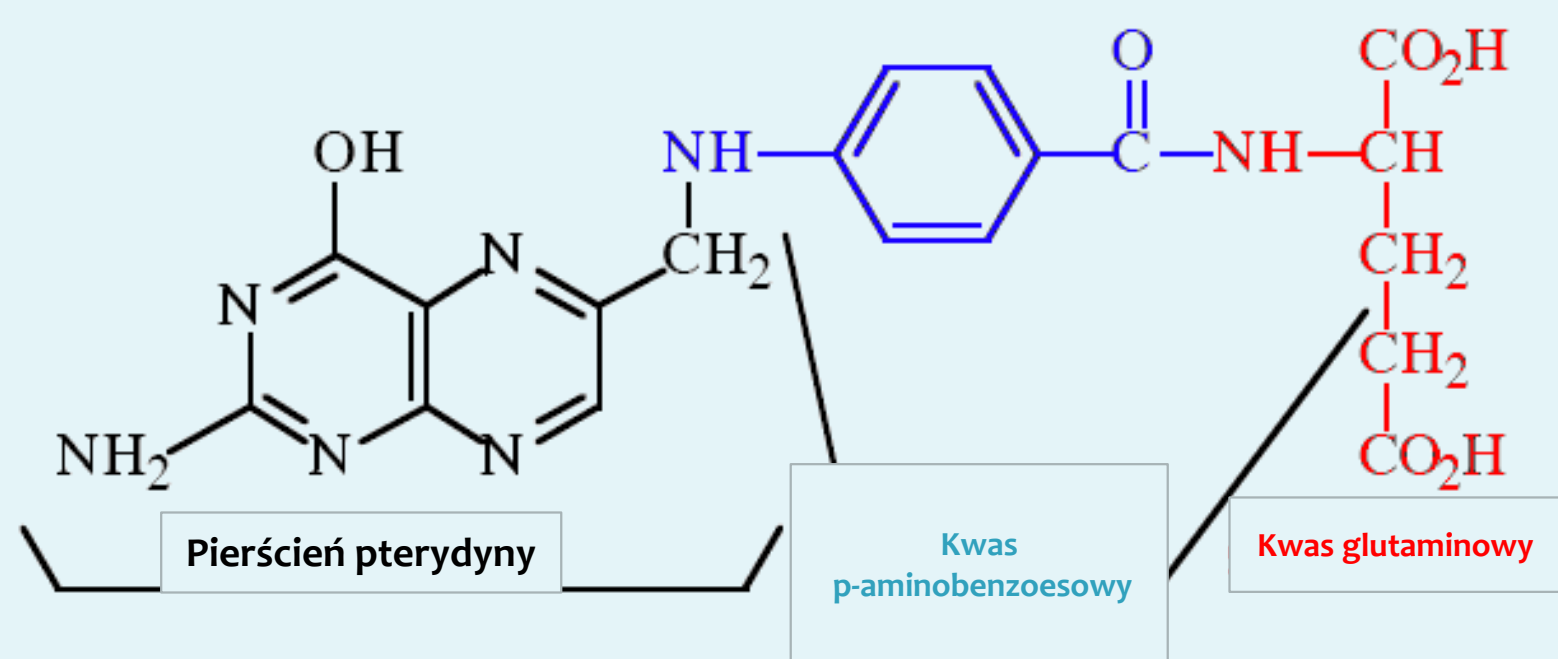


# Zmiana powinowactwa folacyny do białka transportującego w stanach patologicznych

Agnieszka Szkudlarek

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, [aszkuclarek@sum.edu.pl](mailto:aszkuclarek@sum.edu.pl)

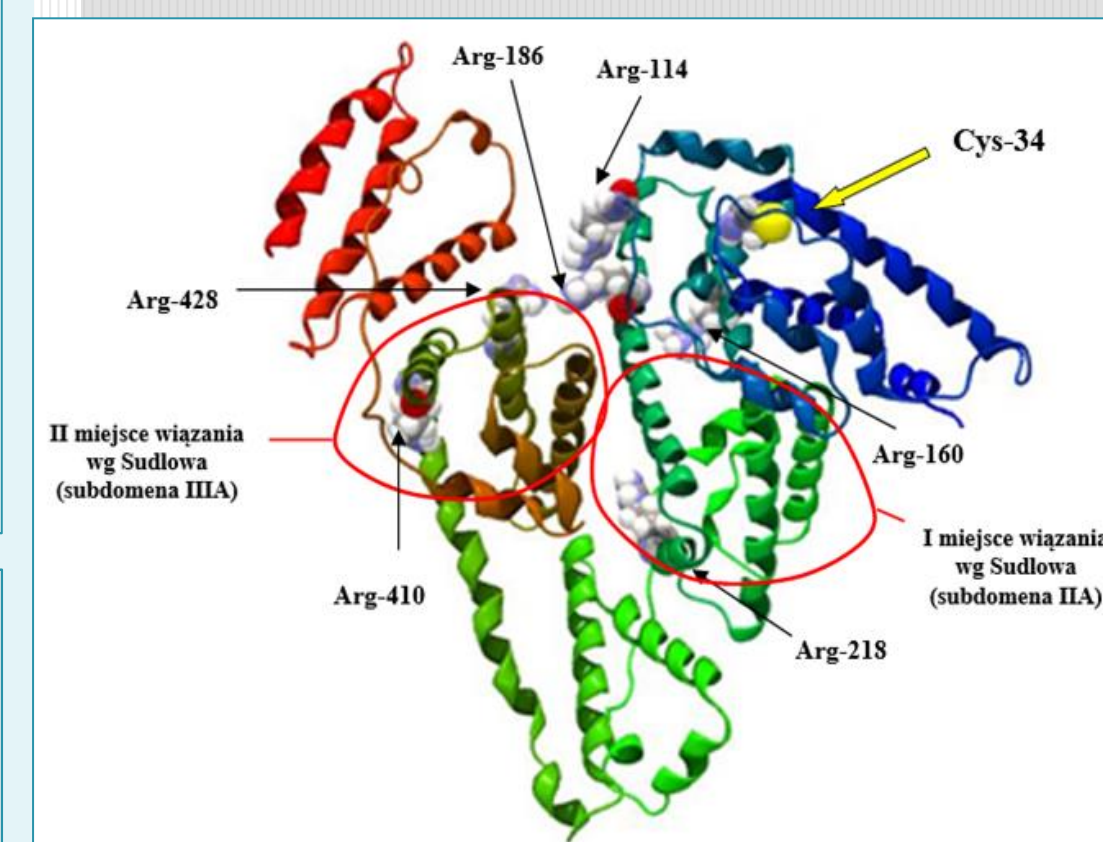
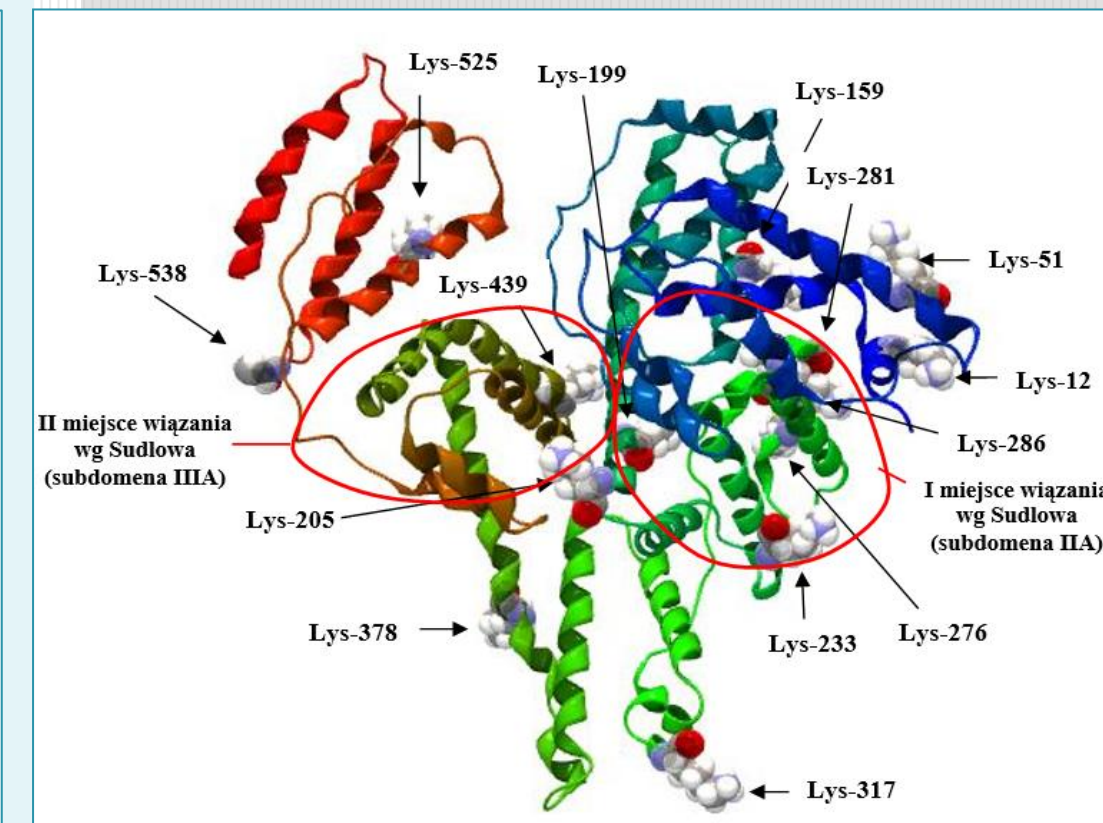


Ryc. 1. Struktura chemiczna kwasu foliowego

## CEL

analiza *in vitro* oddziaływania kwasu foliowego (FA) z niezmienną oraz glikowaną albuminą surowicy krwi ludzkiej (HSA i gHSA) i wołowej (BSA i gBSA) techniką spektrofotometryczną

Kwas foliowy (folacyna, FA, Ryc. 1) jest niezbędną do prawidłowego funkcjonowania komórek witaminą grupy B. Syntetyczny kwas foliowy jest utlenioną i najbardziej stabilną formą kwasu pteroglutaminowego zbudowanego z 3 struktur: 1. zasady pterydynamy (6-metylopteryny), 2. kwasu p-aminobenzoowego (PABA) i 3. kwasu L-glutaminowego. Transporterem kwasu foliowego jest albumina – białko surowicy krwi wiążące zarówno egzo-, jak i endogenne ligandy. Ludzka albumina osocza (ang. Human Serum Albumin, HSA) i bydłęca albumina osocza (ang. Bovine Serum Albumin, BSA) są homologami w 76%. Obie albuminy są dużymi globularnymi białkami zbudowanymi z trzech, homologicznych domen (I, II i III), z których każda posiada dwie subdomeny – A i B. Stabilizację domen zapewnia obecność 17 mostków dwusiarkowych. Albumina jest długo żyjącym białkiem przez co ulega potranslacyjnym modyfikacjom, tj. glikacji białek. Glikacja jest nieenzymatycznym, wieloetapowym procesem polegającym na przyłączaniu się cukrów redukujących (glukoza, fruktoza) do wolnych grup aminowych białka. Glikacja wpływa na zmianę konformacji albuminy co przekłada się na zmianę powinowactwa białka do różnych ligandów.

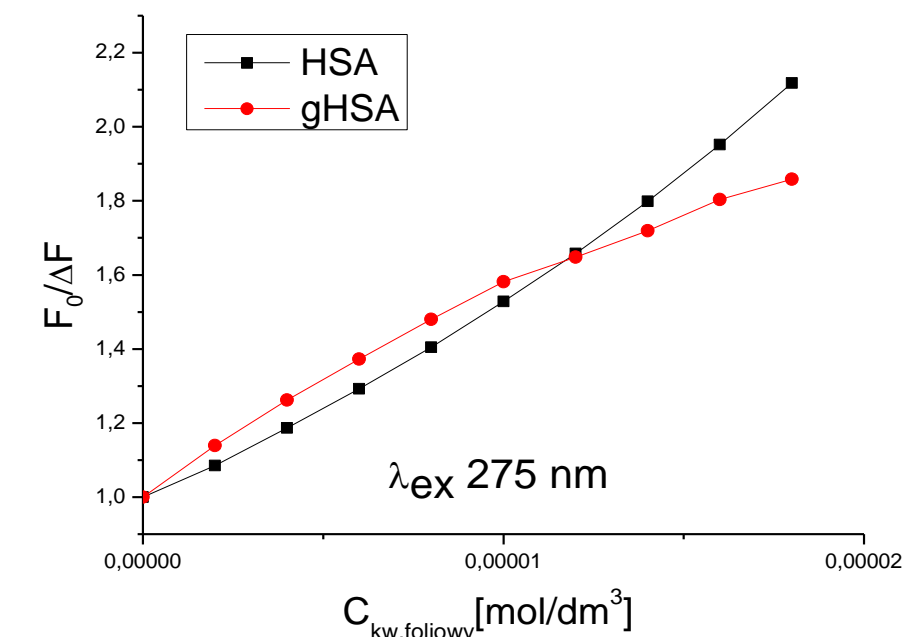
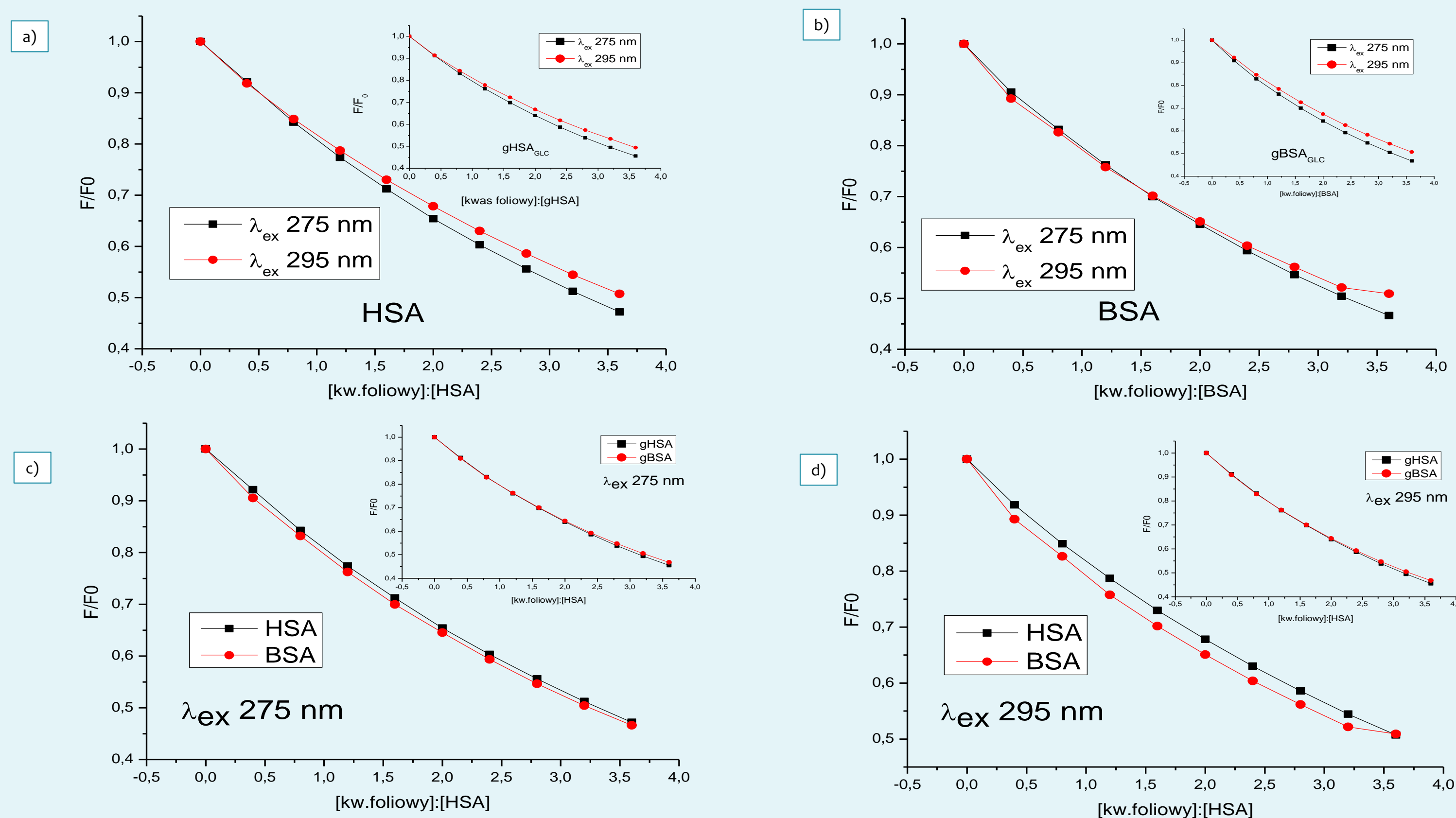


Ryc. 2 Miejsca glikacji *in vivo* w strukturze HSA a) reszty lizyny (Lys), b) reszty arginy (Arg) oraz miejsca wiążące albuminy wg Sudlowa. Wizualizację struktury HSA przeprowadzono przy użyciu programu CLC Drug Discovery Workbench. Strukturę HSA pobrano z bazy danych PDB, ID: 4K2C

## MATERIAŁ I METODY

Roztwory albuminy niezmienniczej (HSA) i glikowanej w obecności 0.1 mol/dm<sup>3</sup> fruktozy (gHSA) o stężeniu 5 x 10<sup>-6</sup> mol/dm<sup>3</sup> oraz wyjściowy roztwór kwasu foliowego (FA) o stężeniu 1 x 10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup> sporządzono w 0.05 mol/dm<sup>3</sup> buforze fosforanowym (pH = 7.4 ± 0.1). Analiza wpływu glikacji na oddziaływanie FA z HSA, gHSA i BSA, gBSA została przeprowadzona metodą wygaszania fluorescencji makrocząsteczek. Fluorescencyjne widma emisyjne białek, bez i w obecności wzrastającego stężenia kwasu foliowego (4 x 10<sup>-6</sup> ÷ 40 x 10<sup>-6</sup> mol/dm<sup>3</sup>), zarejestrowano na spektrofotometrycznej JASCO FP-6500 dla λ<sub>ex</sub> 275nm i λ<sub>ex</sub> 295nm. Parametry pomiarów: zakres rejestracji widm emisyjnych: λ<sub>em</sub> = 285 ÷ 400nm oraz λ<sub>em</sub> = 305 ÷ 400nm, wzmacnienie sygnału: Medium, szybkość skanowania próbki: 200 nm/min, szerokość spektralna pasma (dla monochromatora promieniowania wzbudającego/emiteowanego): 3/3 nm.

## WYNIKI



Ryc. 3 Zależność opisana równaniem Sterna-Volmera w układzie kwas foliowy-HSA oraz kwas foliowy-gHSA, λ<sub>ex</sub> 275nm

Tab. 1 Wartość współczynnika interakcji Hilla (n<sub>H</sub>) dla układu FA-HSA, FA-gHSA oraz FA-BSA i FA-gBSA

Metoda Hilla	n <sub>H</sub>			
	HSA	gHSA	BSA	gBSA
λ <sub>ex</sub> 275nm	0.95	0.96	1.1	-
λ <sub>ex</sub> 295nm	0.81	0.86	1.21	1.15

Tab. 2. Stałe asocjacji K<sub>a</sub> dla kompleksu FA-HSA, FA-gHSA oraz FA-BSA i FA-gBSA dla λ<sub>ex</sub> 275nm i λ<sub>ex</sub> 295nm

Metoda Klotza	K <sub>a</sub> x 10 <sup>4</sup>	
	λ <sub>ex</sub> 275nm	λ <sub>ex</sub> 295nm
HSA	2.85 ± 0.18	4.19 ± 0.15
gHSA	3.94 ± 0.06	4.68 ± 0.25
BSA	5.73 ± 0.37	4.49 ± 0.23
gBSA	10.05 ± 0.42	11.55 ± 1.43

Tab.3. Stałe Sterna-Volmera K<sub>SV</sub> wyznaczone metodą Sterna-Volmera i ułamkowe maksima dostępnej fluorescencji „f<sub>a</sub>” dla układu FA-HSA, FA-gHSA, FA-BSA oraz FA-gBSA dla λ<sub>ex</sub> 275nm i λ<sub>ex</sub> 295nm

Metoda Stern-Volmera	λ <sub>ex</sub> 275nm			λ <sub>ex</sub> 295nm		
	K <sub>SV</sub> x 10 <sup>4</sup>	f <sub>a</sub>	R <sup>2</sup>	K <sub>SV</sub> x 10 <sup>4</sup>	f <sub>a</sub>	R <sup>2</sup>
HSA	1.93 ± 0.19	2.13	0.99	3.42 ± 0.08	0.72	0.99
gHSA	2.97 ± 0.06	0.71	1	3.85 ± 0.16	0.76	0.99
BSA	3.66 ± 0.04	1.18	0.99	2.40 ± 0.18	0.83	0.99
gBSA	4.34 ± 0.02	1.34	0.99	7.19 ± 0.39	1.69	0.99

## WNIOSKI

- Dla układu FA-HSA i FA-gHSA dla λ<sub>ex</sub> 275nm i λ<sub>ex</sub> 295nm współczynnik Hilla n<sub>H</sub> < 1 (Tab.1), co świadczy o negatywnej kooperatywności – wiązanie liganda w jednym miejscu osłabia jego wiązanie w innych miejscach w strukturze makrocząsteczki
- Analiza krzywych Sterna-Volmera dla układu FA-HSA i FA-gHSA dla λ<sub>ex</sub> 275nm (Ryc. 3) dla mniejszych stężeń FA, wykazuje przebieg liniowy (dynamiczne wygaszanie fluorescencji HSA i gHSA w miejscu wiązania FA). Obserwowane przy większych stężeniach FA odchylenia od prostej, mogą świadczyć o zajmowaniu przez cząsteczki FA w pierwszej kolejności łatwo dostępnych miejsc wiązania w strukturze albuminy
- Stała K<sub>SV</sub> i K<sub>a</sub> otrzymana dla kompleksu FA-gHSA i FA-gBSA dla λ<sub>ex</sub> 275nm i λ<sub>ex</sub> 295nm przyjmuje większe wartości niż dla kompleksu FA-HSA i FA-BSA (Tab.2 i Tab.3)

Ze względu na wzrost stężenia albuminy glikowanej w surowicy krwi osób cierpiących na choroby przewlekłe, w tym na cukrzycę, niezwykle ważne jest uregulowanie przyjmowanej przez nich dawki folacyny, celem zachowania homeostazy organizmu i/lub uniknięcia negatywnym konsekwencjom jej przedawkowania