

Wiązanie ketoprofenu do białek osocza w stanach zapalnych

Binding of ketoprofen to plasma protein in inflammatory states

Małgorzata Maciążek-Jurczyk¹, Agnieszka Szkudlarek-Hańnik¹, Dawid Siek²,
Mateusz Chłosta², Kamil Faruga², Wojciech Moskała², Anna Sułkowska¹

STRESZCZENIE

CEL

Albumina surowicy krwi jest ujemnym białkiem ostrej fazy. Jej stężenie maleje w odczynie zapalnym. Celem pracy było zbadanie wiązania ketoprofenu do białek osocza – albuminy surowicy krwi w stanach zapalnych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto albuminę surowicy krwi ludzkiej (HSA, MP Biomedicals TMInc, AuroraOH) oraz ketoprofen (KP, MP Biomedicals TMInc, Eschwege, Germany). Emisyjne widma fluorescencji zarejestrowano na spektrofлуориметrze Hitachi F-2500, stosując kwarcowe kuwety o pojemności 4 cm³ i wymiarach 1 cm x 1 cm x 4 cm. Analiza układu ketoprofen – albumina surowicy krwi ludzkiej (KP–HSA) została przeprowadzona za pomocą techniki wygaszania fluorescencji albuminy surowicy krwi ludzkiej, przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{ex} = 280$ nm. Pomiarom poddano trzy układy KP–HSA₁, KP–HSA₂, KP–HSA₃ o stałym stężeniu HSA (8 x 10⁻⁶M, 4 x 10⁻⁶M, 1 x 10⁻⁶M), bez i w obecności KP o stężeniu rosnącym (1 x 10⁻⁵M ÷ 1.8 x 10⁻⁴M). Wiązanie ketoprofenu do albuminy surowicy krwi ludzkiej określono na podstawie stałych asocjacji K_a [M⁻¹] i wygaszania K_Q [M⁻¹].

WYNIKI

Ketoprofen (KP) wykazuje wysokie zdolności wygaszające i wiążące. Zarejestrowano tworzenie kompleksów z albuminą surowicy krwi (HSA), dla stosunków molowych [KP]:[HSA]₁ 0:1 ÷ 22.5:1, [KP]:[HSA]₂ 0:1 ÷ 45:1 oraz [KP]:[HSA]₃ 0:1 ÷ 180:1. Na podstawie przebiegu krzywych Scatcharda zaobserwowano występowanie dwóch równocennych klas miejsc wiążących w każdym z układów KP–HSA. Wraz z obniżeniem stężenia albuminy, co ma swoje odzwierciedlenie w stanach zapalnych, zarejestrowano wzrost stałych asocjacji K_a [M⁻¹] i wygaszania K_Q [M⁻¹] w I klasie miejsca wiązania. Zjawisko to świadczy o zmniejszeniu odległości między cząsteczką ketoprofenu a wzbudzonym fluoroforem w makromolekule oraz wzroście stabilności utworzonego kompleksu KP–HSA w stanach zapalnych.

¹Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

²Koło Naukowe przy Katedrze
i Zakładzie Farmacji Fizycznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Jagiellońska 4
41-200 Sosnowiec
tel. 32 364 15 80
e-mail: mmaciazek@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 3, 27–33
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

Wartości wyznaczonych parametrów wiązania w II klasie nie uległy zmianie, prawdopodobnie ze względu na obecność oddziaływań hydrofobowych typu π - π , które stabilizują kompleks.

WNIOSKI

Stężenie białka transportowego, które maleje w stanach zapalnych, wpływa na zmiany dostępności względem cząsteczki KP. Wzrost trwałości kompleksu KP-HSA w pierwotnym miejscu wiązania w subdomenie IIIA może przyczynić się do opóźnionego działania leku.

SŁOWA KLUCZOWE

ketoprofen, albumina surowicy krwi ludzkiej, technika wygaszania fluorescencji

ABSTRACT

AIM

Serum albumin is *negative acute – phase protein* which decreases in inflammation. The aim of the study was to determine plasma protein binding of ketoprofen in inflammatory states.

MATERIAL AND METHODS

Human serum albumin (HSA) was provided by MP Biomedicals™ Inc, Aurora OH. Ketoprofen (KP) was purchased from MP Biomedicals™ Inc, Eschwege, Germany. Fluorescent emission spectra were carried out with a Hitachi F-2500 spectrofluorimeter and 1 cm x 1 cm x 4 cm quartz cells. Study of KP-HSA complex has been carried out on the basis of human serum albumin quenching fluorescence technique at excitation wavelength $\lambda_{ex} = 280$ nm. The following systems has been analyzed: KP-HSA₁, KP-HSA₂, KP-HSA₃ at constant concentrations of HSA (8×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 1×10^{-6} M) in the absence and presence of KP at the increasing concentration (1×10^{-5} M ÷ 1.8×10^{-4} M). Plasma protein binding of ketoprofen has been evaluated on the basis of association K_a [M^{-1}] and quenching constants K_Q [M^{-1}].

RESULTS

Ketoprofen (KP) exhibits high ability of quenching and binding. For the molar ratios of [KP]:[HSA]₁, [KP]:[HSA]₂ and [KP]:[HSA]₃ respectively 0:1÷22.5:1, 0:1÷45:1, 0:1÷180:1 the formation of the complex has been observed. Scatchard curves showed two class of equivalent binding sites for KP. With the decrease of serum albumin concentrations, that occurs in inflammatory state, the increase of binding parameters K_a [M^{-1}] and K_Q [M^{-1}] in first class of binding sites has been observed. Because quenching constants indicate the distance between the excited fluorophore and KP, their rise with a reduction of HSA concentration means that KP approaches to fluorophore(s) macromolecule. The formation of the complex whose stability was confirmed by the increase of K_a was then proven. In the second class of values of K_a [M^{-1}] and K_Q [M^{-1}] have not been changed probably due to the presence of π - π hydrophobic interactions which stabilize the KP-HSA complex.

CONCLUSIONS

The decrease of protein concentration in inflammatory affects changes in the availability towards KP molecule. The growth of KP-HSA stability in the primary binding site (subdomain IIIA) can contribute to delayed action.

KEY WORDS

ketoprofen, human serum albumin, quenching fluorescence technique

WSTĘP

Odczyn zapalny jest reakcją obronną organizmu na pojawiający się czynnik uszkodzający struktury tkankowe lub narządowe. Jest wyrazem swoistej, ukierunkowanej i wzmożonej odpowiedzi biochemicznej, hematologicznej oraz immunologicznej na poziomie lokalnym lub ogólnoustrojowym. W reakcji zapalnej wyróżnia się fazę ostrą trwającą od kilkadziesiąt sekund do prawie 12 godzin od zadziałania bodźca, która przechodzi następnie w fazę przewlekłą. W ramach reakcji zapalnej lub podczas uszkodzenia tkanek zostają uwalniane cytokiny prozapalne, które prowadzą do uwolnienia białek ostrej fazy. Białka te biorą udział w regulacji procesu zapalnego oraz modulacji odpowiedzi immunologicznej. Według Kojy, w odczynie zapalnym wyróżnia się 5 grup białek ostrej fazy [1]:

- A – bardzo silnie reagujące, których stężenie w osoczu wzrasta 20–100 razy; zalicza się do nich α_2 -makroglobulinę;
- B – silnie reagujące, ich poziom w osoczu wzrasta 2–5 razy; zalicza się do nich α_1 -kwaśną glikoproteinę, fibrynogen i haptoglobulinę;
- C – o stężeniu wzrastającym o 30–60%; zalicza się do nich ceruloplazminę, α_1 -inhibitor proteinaz, składowe dopełniacza C3 i C4, α_2 -antyplazminę, białko C-reaktywne (CRP) i hemopeksynę;
- D – niewykazujące znacznych zmian stężenia; zalicza się do nich α_1 -makroglobulinę, antytrombinę III i immunoglobuliny;
- E – charakteryzujące się zmniejszeniem stężenia w osoczu o 30–60% wartości fizjologicznej; zalicza się do nich albuminę i transferynę [2].

Albuminy są najliczniej występującymi białkami osocza [3], o stężeniu 40–50 g/l [4], co stanowi 55–65% wszystkich białek krwi. Są stosunkowo małymi cząsteczkami o masie 66,5–66,9 kDa [5], łatwo rozpuszczalnymi w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli w zakresie pH 4,0–8,5. Ze względu na bardzo złożoną i różnorodną strukturę, kształt ich cząsteczki jest uwarunkowany sekwencją tworzących ją aminokwasów. Strukturę trzeciorzędową albuminy surowicy krwi tworzy pofałdowany w kształcie serca o wymiarach 80 x 80 x 80 x 30 Å łańcuch polipeptydowy [6]. Pojedyncza cząsteczka albuminy składa się z trzech homologicznych domen I, II, III,

z których każda podzielona jest na subdomeny A oraz B [3].

Albumina surowicy krwi ludzkiej (HSA) zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z 585 aminokwasów. W strukturze drugorzędowej występuje 17 mostków disulfidowych, jedna wolna grupa tiolowa reszty cysteinykowej w pozycji Cys-34, jedna reszta tryptofanykowa w pozycji Trp-214 oraz 17 reszt tyrozylowych [7]. Jej budowa jest w 67% heliakalna, pozostałe 33% to skręty i długie fragmenty polipeptydowe [4].

Albumina surowicy krwi odpowiada za utrzymanie 75–80% wartości ciśnienia osmotycznego oraz prawidłowego pH we krwi. Jest buforem odgrywającym znaczącą rolę w równowadze kwasowo-zasadowej. Pełni funkcję nośnika we krwi, ma zdolność wiązania i transportu licznych endo- i egzogennych substancji, m.in. witamin, metabolitów, barwników, kwasów tłuszczowych, leków, jonów metali [3].

Wnęki hydrofobowe albuminy są miejscami wiązania wielu ważnych fizjologicznie ligandów, co stwierdzono, stosując techniki dializy równowagowej, krystalografii rentgenowskiej oraz techniki spektroskopowe. W nomenklaturze Sudlowa (1975 r.) oraz Cartera (1989 r.) scharakteryzowano odpowiednio dwa miejsca wiązania do albuminy (miejsce I dla warfaryny oraz II dla benzodiazepiny [8]) oraz sześć miejsc wiążących dla różniących się od siebie pod względem strukturalnym ligandów [6].

Ketoprofen – pochodna kwasu fenylopropionowego – należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Hamuje aktywność COX-1. Wykazuje silne działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe. Jest stosowany w leczeniu objawowym zmian zapalnych i zwyrodnieniowych, w schorzeniach reumatycznych, czasem w łagodzeniu niektórych zespołów bólowych. Bardzo szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając po 60–90 min maksymalne stężenie we krwi.

Wiąże się z wysokim powinowactwem z albuminą surowicy krwi w II miejscu Sudlowa, w pobliżu Tyr-409 zlokalizowanej w subdomenie IIIA [8, 9]. W I miejscu Sudlowa, blisko Tyr-214 znajdującej się w subdomenie IIA znajduje się wtórne miejsce wiązania. Wstrzyknięty domięśniowo lub podany doodbytniczo osiąga to stężenie po 1 godz. Okres półtrwania wynosi 1,5–1,9 godz. Przenika do płynu maziowego, osiągając po 4 godz. większe stężenie niż we krwi. W wysokim stopniu wiąże się

z białkami osocza. Wydalany jest w 55% w postaci metabolitów, głównie z moczem.

Najczęstszymi przeciwwskazaniami do stosowania ketoprofenu są: nadwrażliwość na substancję czynną lub którąkolwiek substancję pomocniczą, reakcje jak po stosowaniu kwasu acetylosalicylowego lub innych NLPZ, czyli: skurcz oskrzeli, astma oskrzelowa, zapalenie błony śluzowej nosa lub pokrzywka, reakcje fotoalergiczne lub fototoksyczne, zaburzenia układu krwiotwórczego, czynna choroba wrzodowa żołądka, przypadki krwawień, owrzodzeń lub perforacji z przewodu pokarmowego, krwawienie z naczyń mózgowych, ciężka niewydolność serca, ciężkie zaburzenia czynności wątroby lub nerek, ostatni trymestr ciąży.

Do działań niepożądanych zalicza się schorzenia ze strony przewodu pokarmowego, układu krążenia i naczyń mózgowych oraz reakcje skórne.

Ponieważ w odczynie zapalnym białko ostrej fazy – albumina surowicy krwi – zmniejsza stężenie w osoczu o 30–60% wartości fizjologicznej, celem przedstawionej pracy była analiza wiązania ketoprofenu do białka transportującego w stanach zapalnych.

MATERIAŁ I METODY

W badaniu zastosowano następujące odczynniki: albuminę surowicy krwi ludzkiej (HSA) frakcja V (MP Biomedicals™ Inc, Aurora OH) oraz ketoprofen (KP) (MP Biomedicals™ Inc, Eschwege, Germany). Roztwory KP oraz HSA zostały sporządzone w buforze fosforanowym 0,05 M o pH = 7,4 ± 0,1 na H₂O destylowanej. Wszystkie pomiary przeprowadzono w temperaturze 37°C.

Analiza układu KP–HSA została przeprowadzona techniką wygaszania fluorescencji albuminy surowicy krwi ludzkiej. Pomiary fluorescencji albuminy wykonano na jednowiązkowym spektrofлуorymetrze Hitachi F-2500. Stosując promieniowanie o długości fali λ_{ex} = 280 nm wzbudzono fluorescencję grup tryptofanowych i tyrozynowych HSA. Błąd aparaturowy wynosił Δλ = 1 nm, ΔRF = 0,01. Pomiarom poddano trzy układy KP–HSA₁, KP–HSA₂, KP–HSA₃ o stałym stężeniu HSA (8 × 10⁻⁶M, 4 × 10⁻⁶M, 1 × 10⁻⁶M), bez i w obecności KP o stężeniu rosnącym (1 × 10⁻⁵M ÷ 1,8 × 10⁻⁴M). Stopień wygaszania fluorescencji HSA przez KP określano względem roztworów

albuminy niezawierającej KP. Opisane roztwory potraktowano jako próbki kontrolne.

W celu zbadania wiązania KP do HSA wyznaczono w układzie KP–HSA stałe asocjacji K_a [M⁻¹] oraz średnią liczbę „a” moli KP związanego tą stałą z jednym molem albuminy, a także stałe wygaszania K_Q [M⁻¹] fluorescencji albuminy dla każdego z zastosowanych jej stężeń.

Stałą asocjacji K_a wyznaczono ze zmodyfikowanego przez Hiratsuka równania Scatcharda (1) [10]:

$$\frac{r}{[L_f]} = n \cdot K_a - K_a \cdot r \quad (1)$$

gdzie: [L_b] – stężenie leku związanego z albuminą, [L_f] – stężenie leku niezwiązanego z albuminą, n – liczba miejsc wiążących, K_a – stała asocjacji kompleksu lek – albumina. $r = \frac{[L_b]}{[X]}$ – liczba moli leku związanego przez 1 mol albuminy, [X] – stężenie albuminy,

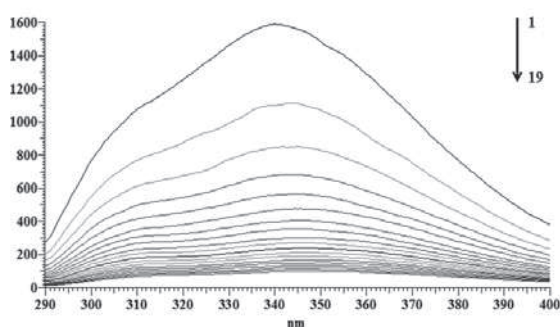
Stałą wygaszania fluorescencji albuminy K_Q wyznaczono ze zmodyfikowanego przez Lehrera równania Sterna-Volmera [11] (2):

$$\frac{RF_0}{\Delta RF} = \frac{1}{[Q]} \cdot \frac{1}{f_a} \cdot \frac{1}{K_Q} + \frac{1}{f_a} \quad (2)$$

gdzie: ΔRF = RF – R_{F0} – przyrost natężenia fluorescencji, – natężenie fluorescencji w obecności i nieobecności liganda, f_a – ułamkowe maksimum dostępnej fluorescencji albuminy sumowanej po n fluoroforach, K_Q – stała wygaszania, [Q] – stężenie liganda.

WYNIKI

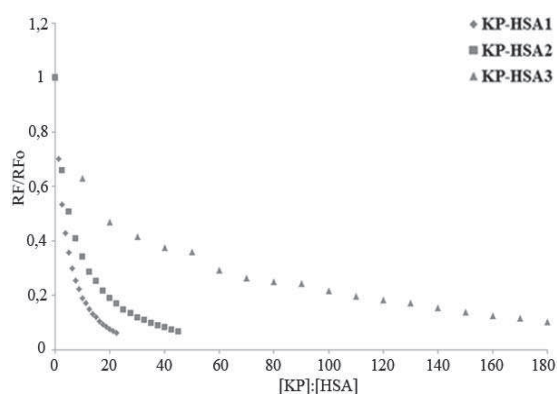
Na podstawie zarejestrowanych emisyjnych widm fluorescencji albuminy surowicy krwi ludzkiej (HSA), wzbudzonej promieniowaniem o długości fali λ_{ex} = 280 nm, w obecności ketoprofenu (KP) zaobserwowano obniżenie intensywności fluorescencji albuminy pod wpływem KP, ze wzrostem jego stężenia. Dla trzech analizowanych stosunków molowych KP–HSA ([KP]:[HSA]₁ 0:1÷22.5:1, [KP]:[HSA]₂ 0:1÷45:1 oraz [KP]:[HSA]₃ 0:1÷180:1) zaobserwowano stopniowe wygaszanie fluorescencji albuminy ze wzrostem stężenia KP. Przykładowe emisyjne widma fluorescencji HSA w obecności KP ([KP]:[HSA]₁ 0:1÷22.5:1) ilustruje rycina 1.



Ryc. 1. Emisyjne widma fluorescencji HSA o stężeniu 8×10^{-6} M (1) w obecności KP o stężeniach 1×10^{-5} M (2)– 1.8×10^{-4} M (19), [KP]:[HSA], 0:1÷22.5:1, $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Fig. 1. The fluorescent emission spectra of HSA (1) ([HSA] 8×10^{-6} M) in the presence of KP ([KP] 1×10^{-5} M (2)– 1.8×10^{-4} M (19)), [KP]:[HSA], 0:1÷22.5:1, $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Na rycinie 2 porównano krzywe wygaszania fluorescencji HSA w obecności KP, dla trzech układów KP–HSA₁÷KP–HSA₃.

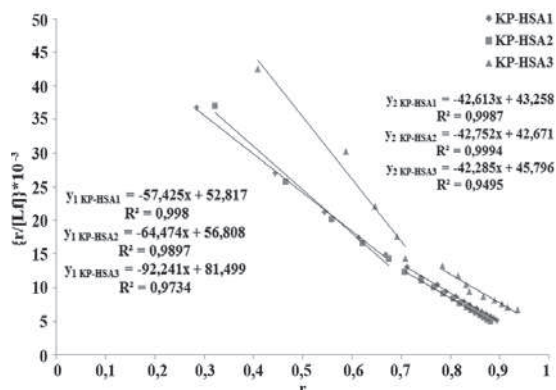


Ryc. 2. Krzywe wygaszania fluorescencji HSA o stężeniach 8×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 1×10^{-6} M w obecności KP o stężeniach 1×10^{-5} M– 1.8×10^{-4} M, [KP]:[HSA]₁ 0:1÷22.5:1, [KP]:[HSA]₂ 0:1÷45:1, [KP]:[HSA]₃ 0:1÷22.5:1, $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Fig. 2. The quenching of HSA ([HSA] 8×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 1×10^{-6} M) fluorescence in the presence of KP ([KP] 1×10^{-5} M– 1.8×10^{-4} M), [KP]:[HSA]₁ 0:1÷22.5:1, [KP]:[HSA]₂ 0:1÷45:1, [KP]:[HSA]₃ 0:1÷22.5:1, $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Na podstawie równania (1) wykreślono krzywe Scatcharda (ryc. 3), z których wyznaczono stałe asocjacji K_a [M⁻¹], świadczące o trwałości utworzonego kompleksu, oraz średnią liczbę cząsteczek leku „a” przypadającą na jedną cząsteczkę albuminy ludzkiej „a” dla każdego z układów KP–HSA (tab. I).

Przebieg krzywych Scatcharda sugeruje występowanie więcej niż jednej klasy miejsc



Ryc. 3. Krzywe Scatcharda wyznaczone w układach KP–HSA₁÷KP–HSA₃.

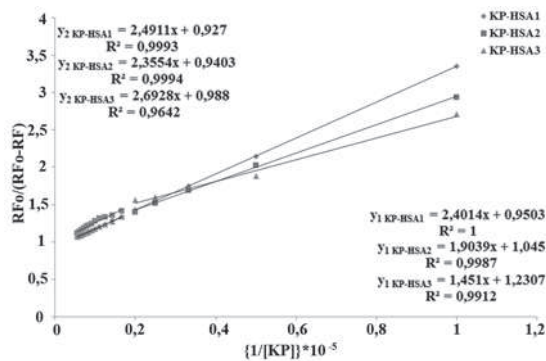
Fig. 3. The Scatchard curves in KP–HSA₁÷KP–HSA₃ systems.

wiązujących cząsteczkę ketoprofenu (KP) w cząsteczce HSA. I klasa miejsc wiążących występuje dla stosunku molowego [KP]:[HSA]₁ 1.25:1÷6.25:1, [KP]:[HSA]₂ 2.5:1÷12.5:1 oraz [KP]:[HSA]₃ 10:1÷50:1. Dla stosunku molowego [KP]:[HSA]₁ 6.25:1÷22.5:1, [KP]:[HSA]₂ 12.5:1÷45:1 i [KP]:[HSA]₃ 50:1÷180:1 zaobserwowano istnienie II klasy miejsca wiązania. Korzystając z równania (2) wykreślono zmodyfikowane krzywe Sterna-Volmera (ryc. 4) i wyznaczono stałe wygaszania K_Q [M⁻¹] dla każdej klasy miejsca wiązania, świadczące o dostępności KP do wzbudzonego fluoroforu albuminy surowicy krwi ludzkiej o stężeniu stałym, w każdym układzie niższym. Stałe wygaszania K_Q [M⁻¹] dla układów KP–HSA₁÷KP–HSA₃ zebrano w tabeli I.

Tabela I. Wartości stałych asocjacji K_a [M⁻¹] oraz wygaszania K_Q [M⁻¹] wyznaczone w układach KP–HSA₁÷KP–HSA₃

Table I. Values of association K_a [M⁻¹] and quenching K_Q [M⁻¹] constants obtained in the KP–HSA₁÷KP–HSA₃ systems

Wartość	KP–HSA ₁	KP–HSA ₂	KP–HSA ₃
$K_{aI} \times 10^{-5}$ [M ⁻¹]	0,57	0,64	0,92
a_I	0,92	0,88	0,88
$K_{aII} \times 10^{-5}$ [M ⁻¹]	0,43	0,43	0,43
a_{II}	1,01	1,00	1,08
$K_{QI} \times 10^{-5}$ [M ⁻¹]	0,39	0,55	0,85
$K_{QII} \times 10^{-5}$ [M ⁻¹]	0,37	0,40	0,37



Ryc. 4. Krzywe Sterna-Volmera wyznaczone w układach KP-HSA₁, KP-HSA₂, KP-HSA₃.

Fig. 4. The Stern-Volmer curves in KP-HSA₁, KP-HSA₂, KP-HSA₃ systems.

DYSKUSJA

Podstawowym warunkiem zjawiska wygaszania fluorescencji jest mniejsza niż 10 nm odległość między cząsteczką leku, zwanego wygaszaczem, a albuminą surowicy krwi [11,12]. Zastosowanie promieniowania o długości fali $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm wzbudza w albuminie surowicy krwi ludzkiej Trp-214 zlokalizowany w subdomenie IIA oraz reszty grup tyrozylowych znajdujących się także w subdomenie IIA (Tyr-263) oraz IB, IIB, IIIA. Rolę tyrozyn, a przede wszystkim Tyr-411, 409 i Arg-410 (subdomena IIIA) w oddziaływaniach elektrostatycznych NLPZ z albuminą ludzką potwierdzili Watanabe i wsp. [13] oraz Mao i wsp. [14]. Rahman i wsp. zajmowali się charakterystyką miejsca wiązania NLPZ, m.in. ketoprofenu w cząsteczce HSA, stosując metody dializy równowagowej, CD i fluorescencyjną. Dowiedli, iż obecność grupy karboksylowej w strukturze NLPZ determinuje jego miejsce wiązania do HSA. Podczas oddziaływania grupy karboksylowej NLPZ z HSA szczególną rolę odgrywa obecność reszt tyrozyny, lizyny oraz histydyny [15].

Albumina surowicy krwi jest ujemnym białkiem ostrej fazy. Podczas reakcji zapalnych jej stężenie maleje. Aby zbadać wiązanie KP stosowanego w stanach zapalnych do białka transportowego HSA, analizowano emisyjne widma fluorescencji HSA w obecności KP, wraz ze wzrostem jego stężenia. Mniejsze stężenie HSA w każdym z kolejnych układów odpowiada zmianom stężenia albuminy w stanach zapalnych w warunkach *in vitro*. Emisyjne widma fluorescencji HSA w układach KP-HSA₁, KP-HSA₂ oraz KP-HSA₃ o stężeniu mniejszym

w każdym z kolejnych układów, wzbudzonych promieniowaniem o długości $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm w obecności KP wskazują na zmniejszenie intensywności fluorescencji fluoroforów Trp-214 oraz reszt tyrozylowych znajdujących się w strukturze albuminy (ryc. 1). Ze wzrostem stężenia KP zmalała dostępność fluoroforów dla kolejnych cząsteczek leku. Zmniejszenie intensywności fluorescencji albuminy surowicy krwi świadczy o przejmowaniu przeważającej części energii pochodzącej od wzbudzonych Trp-214 oraz reszt grup tyrozylowych i tworzeniu kompleksów z HSA [16], bez względu na jej końcowe stężenie. Tworzenie kompleksu KP-HSA potwierdza przebieg krzywych wygaszania fluorescencji w obecności KP (ryc. 2), który wskazuje na zmniejszenie wysycenia kompleksu wraz z obniżeniem stężenia albuminy.

Przebieg krzywych Scatcharda (ryc. 3) sugeruje występowanie dwóch klas miejsc wiązających w każdym z układów KP-HSA. Wartości stałych K_a w I klasie miejsc wiązających (IIIA [13, 14]), która jest pierwotnym miejscem wiązania, są zbliżone do wyznaczonych w II klasie (IIA) (tab. I). Ich podobieństwo świadczy o równocześnieści miejsc wiązania w subdomenach IIIA oraz IIA w momencie tworzenia kompleksu. Wraz z obniżeniem stężenia albuminy, co ma odzwierciedlenie w stanach zapalnych, rośnie stała asocjacji w I klasie miejsca wiązania. Zjawisko to może świadczyć o wzroście trwałości kompleksu KP-HSA. Zwiększenie stabilności w miejscu wiązania w subdomenie IIIA może przyczynić się do opóźnionego działania leku. Mimo obniżenia stężenia HSA, stała asocjacji w II klasie miejsca wiązania nie uległy zmianie. Zjawisko to tłumaczy obecność oddziaływań hydrofobowych typu $\pi - \pi$ między pierścieniami aromatycznymi cząsteczek KP a pierścieniami aromatycznymi aminokwasów w obrębie subdomeny IIA (Trp-214) występujących w makromolekule, które stabilizują trwałość kompleksu. Ze wzrostem stałej wiązania KP do cząsteczki albuminy w I klasie miejsca wiązania maleje średnia liczba cząsteczek leku przypadająca na jedną cząsteczkę albuminy. W obrębie subdomeny IIA liczba ta nie ulega zmianie. Wraz z obniżeniem stężenia HSA rosną także wartości stałych wygaszania tylko w pierwotnym miejscu wiązania (ryc. 4, tab. I). Ponieważ stałe wygaszania świadczą o odległości cząsteczki KP od wzbudzonego fluoroforu, ich wzrost wraz z obniżeniem stężenia HSA w stanach zapalnych związany jest

ze zbliżeniem cząsteczki KP do makromolekuły i tworzeniem kompleksu, którego stabilność została potwierdzona wzrostem stałych asocjacji K_a .

WNIOSKI

1. Zastosowany w pracy ketoprofen (KP) wykazuje duże zdolności wygaszające i wiążące.

2. Technika wygaszania fluorescencji albuminy surowicy krwi ludzkiej (HSA), której stężenie zmniejsza się w stanach zapalnych, pozwoliła na stwierdzenie, iż końcowe stężenie białka transportowego wpływa na zmiany dostępności albuminy względem cząsteczki KP.

3. Wzrost trwałości kompleksu KP-HSA w pierwotnym miejscu wiązania w subdomenie IIIA może przyczynić się do opóźnionego działania leku.

PIŚMIENNICTWO

- Koj A. Biological functions of acute phase proteins. W: The acute phase response to injury and infection. Red. A.H. Gordon, A. Koj. Elsevier, Amsterdam–New York–Oxford 1985: 145–160.
- Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis. Markers* 2008; 25: 267–278.
- Carter D.C., He X.M. Structure of serum albumin. *Science* 1990; 249: 302–303.
- He X.M., Carter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992; 358: 209–215.
- Nicholson J.P., Wolmarans M.R., Park G.R. The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.* 2000; 85: 599–610.
- Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 1994; 45: 153–203.
- Chuang V.T.G., Otagiri M. How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin. *Pharm. Res.* 2002; 19: 1458–1464.
- Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 1975; 11: 824–832.
- Monti S., Ottani S., Manoli F. et al. Chiral recognition of 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid (ketoprofen) by serum albumin: an investigation with microcalorimetry, circular dichroism and molecular modelling. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009; 11: 9104–9113.
- Hiratsuka T. Conformation changes in the 23-kilodalton NH_2 -terminal peptide segment of myosin ATPase associated with ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 18786–18790.
- Eftink M.R., Ghiron C.A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* 1976; 15: 672–680.
- Maciążek-Jurczyk M., Sułkowska A., Bojko B., Równicka J., Sułkowski W.W. Fluorescence analysis of competition of phenylbutazone and methotrexate in binding to serum albumin in combination treatment in rheumatology. *J. Mol. Struct.* 2009; 924–926: 378–384.
- Watanabe H., Tanase S., Nakajou K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M. Role of Arg-410 and Tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem. J.* 2000; 349: 813–819.
- Mao H., Hajduk P.J., Craig R., Bell R., Borre T., Fesik S.W. Rational design of diflunisal analogues with reduced affinity for human serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 10429–10435.
- Rahman M.H., Yamasaki K., Shin Y.H., Lin C.C., Otagiri M. Characterization of high affinity binding sites of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to site-specific probes on human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 1993; 16: 1169–1174.
- Sułkowska A., Maciążek-Jurczyk M., Bojko B. et al. Competitive binding of phenylbutazone and colchicine to serum albumin in multidrug therapy: A spectroscopic study. *J. Mol. Struct.* 2008; 881: 97–106.