

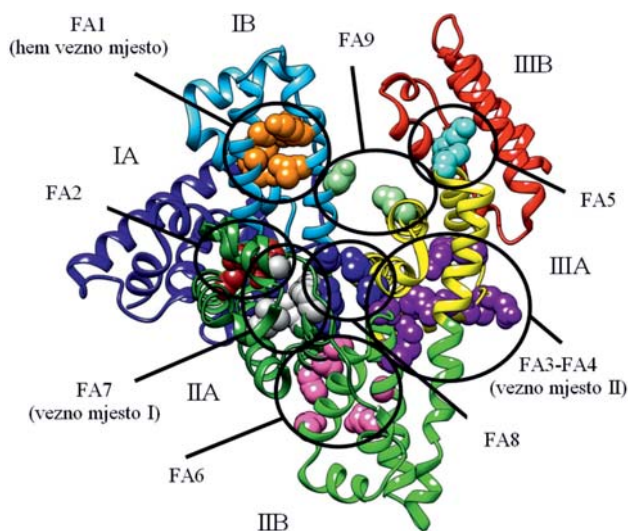
Humani serumski albumin – najvažniji transportni protein u krvi

HRVOJE RIMAC, MIRZA BOJIĆ

Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku kemiju, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

UVOD

Humani serumski albumin (HSA) je najzastupljeniji protein u ljudskoj plazmi s koncentracijom u zdravih ljudi 500–750 μM (35–50 g/L) te čini otprilike 60 % mase svih proteina u plazmi (1). Sintetizira se u hepatocitima kao jednolančani glikozilirani protein relativne molekulske mase 66.500 Da, a sastoji se od 585 aminokiselinskih ostataka koji su organizirani u tri strukturno slične domene oblika α uzvojnice (I–III), od koji se svaka sastoji od dvije poddomene (A i B) (2) (slika 1.). Trodimenzijski, HSA je srolikog oblika s približnim dimenzijama 80×80×30 Å s 35 cisteinskih aminokiselinskih ostataka, od kojih svi osim jednog (Cys 34 u domeni I) tvore disulfidne mostove i time stabiliziraju molekulu. Zbog svog visokog neto naboja



Slika 1. Helikalna struktura HSA s označenim poddomenama i mjestima vezanja masnih kiselina (FA1–FA9) (PDB unos 2BXD) (8)

od –15 pri pH 7,0 iznimno je topljiv u krvnoj plazmi (1, 2). U tijelu ima mnogo-brojne uloge, kao što su regulacija onkotskog tlaka i pH krvne plazme, ima i (pseudo) enzimski i antioksidativna svojstva, a služi i za skladištenje i prijenos endobiotika i ksenobiotika (3), posebice hidrofobnih organskih aniona srednje veličine (100–600 Da), kao što su bilirubin, dugolančane masne kiseline, hematin, tiroksin i mnogi drugi, na taj im način produžujući poluživot u cirkulaciji i regulirajući koncentraciju u krvi (4, 5). Mnogi se lijekovi vežu za jedno od dva glavna vezna mjesta, smještena u poddomenama IIA i IIIA (Sudlowljeva mjesta I i II), s time da se više spojeva veže u poddomeni IIA (6, 7). Vezno mjesto I, u poddomeni IIA, je prostrano i sastoji se od nekoliko zasebnih veznih mjesta u koja se mogu smjestiti ligandi vrlo različitih kemijskih struktura. Vezno mjesto II, u poddomeni IIIA, manjeg je volumena te je također i manje fleksibilno i stoga se tu mogu vezati samo strukturno slični ligandi (8).

Vežanje fizioloških liganada na HSA

HSA je glavni transporter neesterificiranih masnih kiselina (engl. *Fatty Acid*) u plazmi, što predstavlja njegovu osnovnu fiziološku funkciju. Dosad je otkriveno 9 veznih mjesta za masne kiseline (FA1–FA9) koja se nalaze u različitim poddomenama, pri čemu se neka od njih preklapaju s veznim mjestima za druge spojeve, uključujući i ksenobiotike (lijekove) (slika 1.). Najvažnija od njih su FA1 koje se preklapa s veznim mjestom za hem, FA3–FA4 koje se preklapa s veznim mjestom II u poddomeni IIIA te FA7 koje se preklapa s veznim mjestom I u poddomeni IIA. Sadržaj masnih kiselina u plazmi nije stalan pa tako može utjecati na istodobno vežanje drugih liganada (3, 9–11).

Drugi fiziološki ligand HSA je bilirubin, završni produkt katabolizma hema. Vežanjem na HSA (99,99 %), toksičnost bilirubina je značajno smanjena. Prijašnja su istraživanja upućivala da se vezno mjesto visokog afiniteta nalazi u poddomeni IIA, kao i u blizini veznog mjesta II, ali su novije studije pokazale da se primarno vezno mjesto bilirubina nalazi u poddomeni IB, u blizini veznog mjesta za hem (12).

Tiroksin se veže za HSA koji nema vezanih masnih kiselina na četiri mjesta, koja se označavaju od Tr-1 do Tr-4, a djelomično se preklapaju s FA7, FA3–FA4 i FA5. Masne se kiseline natječu s tiroksinom za vežanje na sva četiri vezna mjesta, sprječavajući njegovo vežanje. Pri visokim koncentracijama, masne kiseline također mogu inducirati promjene u 3D strukturi HSA, što za posljedicu ima formiranje petog tiroksinskog veznog mjesta, Tr-5 na području FA9 (3, 13). Određene HSA genetske varijante pokazuju viši afinitet za tiroksin, što dovodi do manjeg postotka slobodnog tiroksina u krvi i posljedično do povećane sinteze tiroksina (3). Pomoću ovog mehanizma koncentracija slobodnog tiroksina ostaje unutar normalnog raspona, ali njegova ukupna koncentracija je viša, što može dovesti do pogrešne dijagnoze hipertireoidizma te do nepotrebnog liječenja ovog simptoma, poznatog kao obiteljska disalbuminemična hipertiroksinemija (14).

Povezanost strukture i afiniteta (SAR) lijekova pri vezanju za HSA

Tipični lijekovi koji se vežu za HSA su lipofilni lijekovi i većina ih se veže ili u poddomeni IIA ili u poddomeni IIIA. Tipični lijek poddomene IIA je dikarboksilna kiselina ili velika heterociklična molekula s negativnim nabojem u sredini molekule, a tipični lijek poddomene IIIA je karboksilna kiselina s negativno nabijenom kiselinskom skupinom na jednom kraju molekule s hidrofobnim središnjim dijelom molekule. Nažalost, osim ovih općenitih pravila, ne može se puno više reći da bi se objasnilo ili predvidjelo vezanje liganada na HSA (11). Kragh-Hansen je u svom preglednom radu usporedio nekoliko strukturno sličnih lijekova koji se značajno razlikuju u vezanju za HSA (10). Primjerice, jopanoat se razlikuje od jofenoksata u tome što sadrži amino skupinu umjesto hidroksilne skupine. Unatoč tome, ta dva lijeka imaju različita mjesta visokog afiniteta vezanja na HSA. Nadalje, ampicilin, koji se razlikuje od penicilina G u jednoj amino skupini, može istisnuti bilirubin, za razliku od penicilina G. Još jedan primjer je benzoat koji također istiskuje bilirubin, dok vezanje parahidroksibenzoata rezultira stvaranjem stabilnog ternarnog kompleksa. Također, *L*-triptofan se veže otprilike 100 puta jače od *D*-triptofana, dok je razlika u jačini vezanja između *R*- i *S*-oksazepam 30–40 puta. S druge strane, afiniteti za *R*- i *S*-varfarin su otprilike jednaki, kao i za *R*- i *S*-progesteron i aldosteron, iako se konstante vezanja steroida razlikuju u slučaju α - ili β -vezanih supstituenata (10).

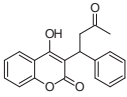
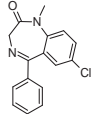
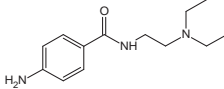
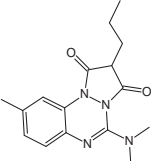
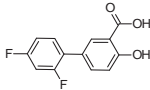
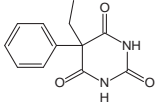
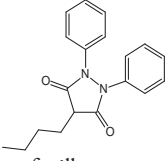
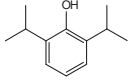
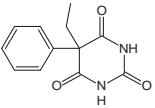
Lijekove koji imaju visoki afinitet za HSA treba davati u višim dozama da bi im se postigla učinkovita koncentracija; ti lijekovi posljedično sporo dolaze do mjesta djelovanja i sporo se eliminiraju (15). Kao što je već rečeno, lijekovi koji se vežu za HSA su uglavnom lipofilni i vezanjem za HSA im se povećava metabolička stabilnost i poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$). U takvim slučajevima, učestalost doziranja se može smanjiti, a lijek vezan za HSA može služiti kao skladište. S druge strane, povećavanje nevezanog udjela lijeka ga čini manje podložnim iznenadnim povišenjima aktivne koncentracije, ali također i snizuje $t_{1/2}$ (16, 17).

Iako je visok postotak vezanja za HSA svojstvo lipofilnih lijekova, korelacija između lipofilnosti i vezanja za HSA se zasad utvrdila samo za kongeneričke serije spojeva, dok su za strukturno različite skupine molekula lipofilnost i vezanja na HSA slabo korelirani (18), što se objašnjava vezanjem strukturno različitih spojeva na različita vezna mjesta (15). Zanimljiv slučaj je vezanje fenilbutazona i oksifenbutazona. Iako se obje molekule vežu u središtu veznog mjesta u poddomeni IIA, zbog prisutnosti hidroksilne skupine, oksifenbutazon je zaokrenut 180° s obzirom na fenilbutazon kad su vezani na HSA bez masnih kiselina, dok im je u prisutnosti masnih kiselina orijentacija slična. To nam govori kako čak i neznatne strukturne promjene u molekularnoj strukturi mogu imati nepredvidljive učinke na vezanje lijekova (8).

Primjeri nekoliko lijekova koji su u velikom postotku vezani za vezna mjesta u poddomenama IIA i IIIA, kao i lijekova koji nisu značajno vezani za HSA prikazani su u tablici 1. Lijekovi vezani u poddomenama IIA i IIIA imaju središnje i krajnje

smještenu elektronegativnu skupinu. S druge strane, prokainamid je pri pH 7,4 pozitivno nabijen i veže se samo 10–15 %, dok su fenobarbiton i teofilin samo 40 % vezani. To se može objasniti činjenicom da, iako fenobarbiton i teofilin imaju parcijalno negativne keto skupine, one su jednoliko raspoređene po cijeloj molekuli što rezultira smanjenom lokalizacijom negativnog naboja i slabijim vezanjem. Drugi primjeri lijekova s niskim postotkom vezanja za HSA su etosuksimid, primidon, različiti cefalosporini, aminoglikozidi, digitoksin i dr. (15, 19).

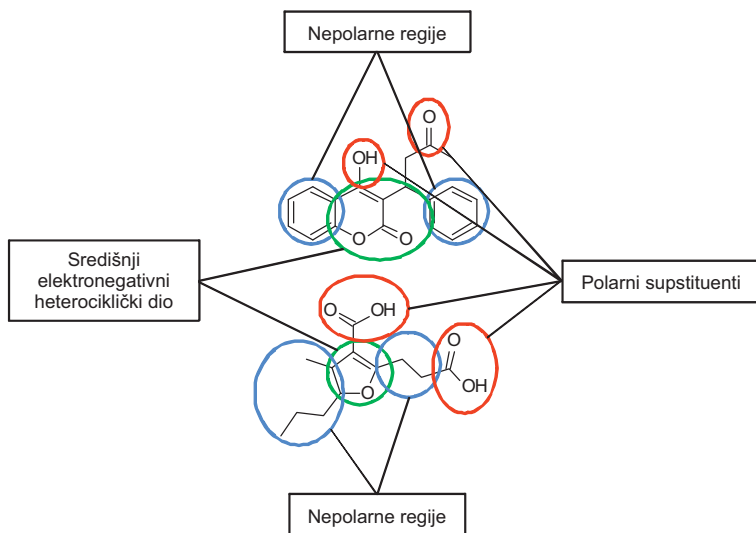
Tablica 1. Primjeri lijekova koji se snažno vežu u poddomenama IIA i IIIA i lijekova koji nisu značajno vezani za HSA.

Lijekovi koji se vežu u poddomeni IIA	Postotak vezanja u poddomeni IIA	Lijekovi koji se vežu u poddomeni IIIA	Postotak vezanja u poddomeni IIIA	Lijekovi koji nisu značajno vezani za HSA	Postotak vezanja za HSA
 varfarin	99 % (15)	 diazepam	99 % (15)	 prokainamid	10–15 % (19)
 azapropazon	99 % (15)	 diflunisal	99 % (15)	 fenobarbiton	40 % (19)
 fenilbutazon	97,8 % (15)	 propofol	95–99 % (20)	 teofilin	40 % (19)

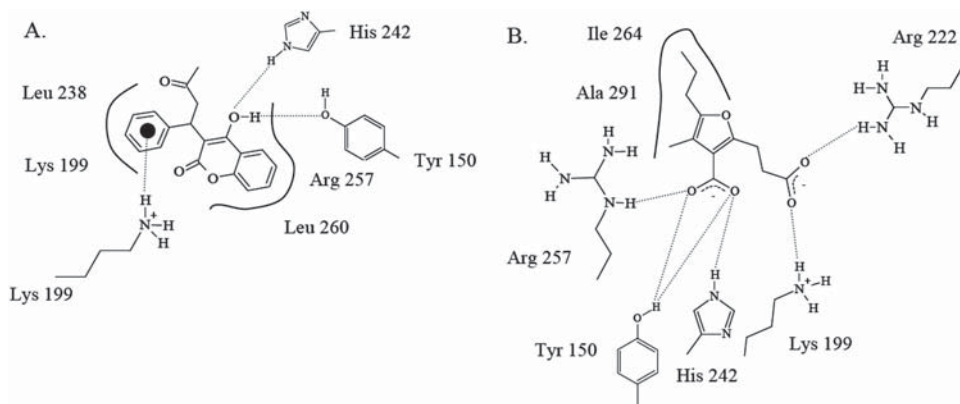
Vežno mjesto u poddomeni IIA

Vežno mjesto u poddomeni IIA se još naziva i Sudlowljevo mjesto I (ili jednostavnije, vezno mjesto I), odnosno varfarin–azapropazonsko mjesto. Na to se vezno mjesto veže najveći broj lijekova i ono se nalazi u blizini triptofanskog aminokiselin-skog ostatka Trp 214. Fehske i sur. (21, 22) su utvrdili da se to vezno mjesto sastoji od dva preklapajuća vezna područja za varfarin i azapropazon. Kasnije su Yamasaki i sur. (23) predložili tri vezna područja, podmjesta Ia, Ib i Ic, koja se nalaze unutar veznog mjesta I, što su kasnije kristalografski potvrdili Zhu i sur. (24).

Kao što je već navedeno, ligandi koji se snažno vežu za to vezno mjesto općenito su dikarboksilne kiseline ili velike heterocikličke molekule s negativnim nabojem u sredini molekule (slike 2. i 3.) te se istodobno mogu vezati dva ili više liganda (11). Cijelo se vezno mjesto sastoji od dva nepolarne vezna džepa s nekoliko središnje smještenih polarnih aminokiselina. Vezno mjesto pokazuje preferenciju prema koplanarnim aromatskim spojevima koji mogu ući u pukotinu i tvoriti vodikove veze. SAR studija vezanja cefalosporina na HSA je pokazala da se anionski cefalosporini vežu najjače, dok se kationski cefalosporini vežu najslabije, a vezanje neioniziranih cefalosporina raste porastom njihove lipofilnosti (25).



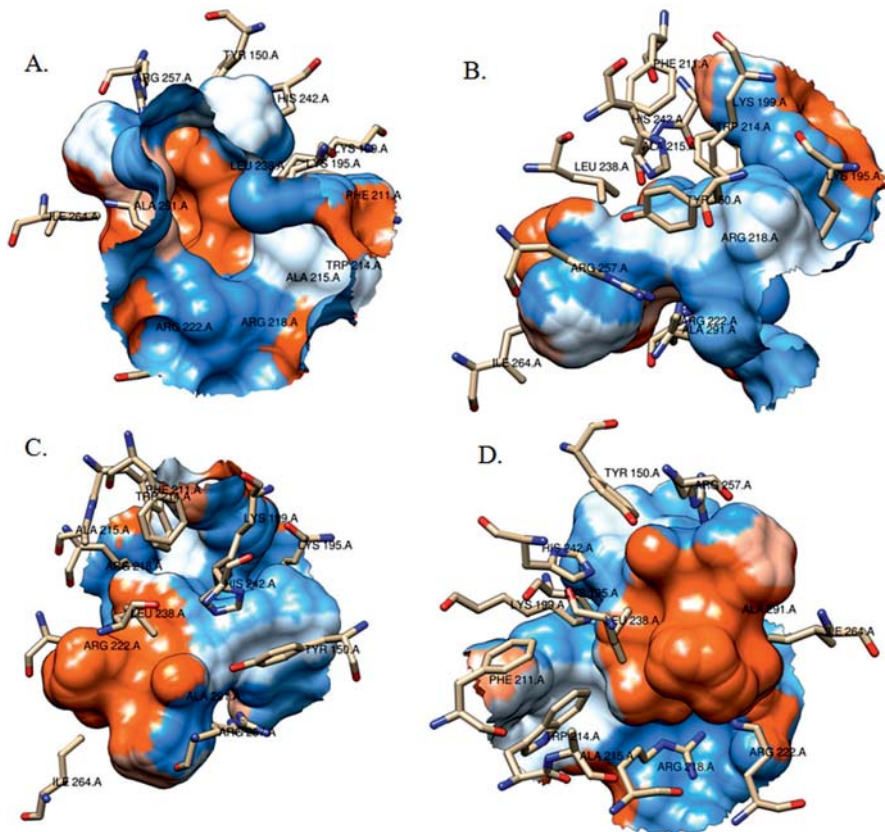
Slika 2. Strukturna svojstva varfarina (gore) i 3-karboksi-4-metil-5-propil-2-furanpropionata (CPMF) (dolje)



Slika 3. Interakcije između A. varfarina (PDB unos 2BXD) i B. 3-karboksi-4-metil-5-propil-2-furanpropionata (CPMF) s veznim mjestom I (PDB unos 2BXA) (8)

Svojstva veznog mjesta u poddomeni IIA

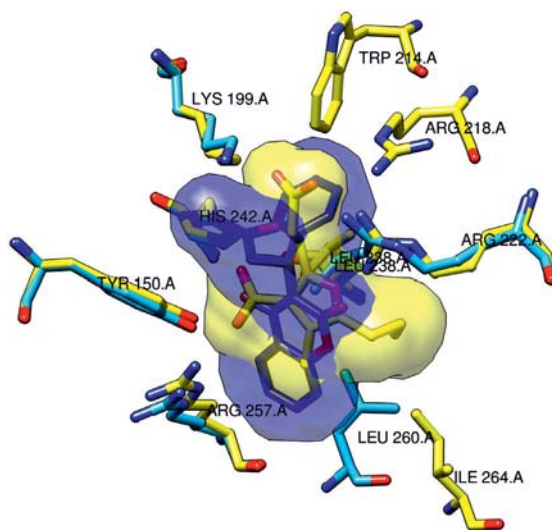
Vezno mjesto u poddomeni IIA sastoji se od tri vezna područja koja se djelomično preklapaju, što predstavlja problem u definiranju osnovnih strukturnih svojstava njegovih liganada (23). Skupina bazičnih aminokiselinskih ostataka (Lys 195, Lys 199, Arg 218 i Arg 222) nalazi se na ulazu u vezno mjesto (slika 4.A), dok se druga skupina (Tyr 150, His 242 i Arg 257) nalazi na kraju dubljeg (lijevog) džepa (slika 4.B). Središnja regija dijeli vezno mjesto u dva džepa. Dublji džep je još jednom podijeljen u dva dijela s Ile 264 (slika 4.C), dok je drugi (desni) džep omeđen s Phe 211, Trp 214, Ala 215, Leu 238 i alifatskim dijelovima Lys 199 i Arg 218 (slika 4.D) (8). Ulaz veznog mjesta je širok i sastoji se od fleksibilnih postraničnih lanaca, što mu omogućuje vezanje različitih supstituentskih skupina. S druge strane, ligandi poput 3-karboksi-4-metil-5-propil-2-furanpropionata (CMPF), oksifenbutazona, fenilbutazona,



Slika 4. Vezno mjesto u poddomeni IIA. Hidrofilne aminokiseline su označene plavo, hidrofobne narančasto, a neutralne bijelo. A. Hidrofilni ulaz veznog mjesta omeđenog polarnim aminokiselinama Lys 195, Lys 199, Arg 218 i Arg 222, B. Druga skupina polarnih aminokiselina Tyr 150, His 242 i Arg 257, C. Dno dubljeg veznog džepa podijeljenog u dva dijela s Ile 264, D. Manji hidrofobni džep omeđen s Phe 211, Trp 214, Ala 215, Leu 238 i alifatskim dijelovima Lys 199 i Arg 218, gledano odostraga

varfarina, pa čak i glukoze vežu se u središtu džepa sa svojom planarnom grupom umetnutom između nepolarnih postraničnih lanaca Leu 238 i Ala 291 i tvore vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom Tyr 150 (slika 4.B), koja ima središnju ulogu u vezanju lijekova (8, 26). Zbog prostranosti ovog veznog mjesta, ligandi nisu sterički ograničeni i različiti ligandi se mogu istodobno vezati, što omogućuje vezanje i molekula vode. Molekule vode mogu pomoći pri stvaranju interakcija između liganada i HSA (8), ali isto tako mogu objasniti nedostatak stereoselektivnosti za varfarin (27). S obzirom na to da se u veznom mjestu I nalaze dvije skupine polarnih aminokiselinskih ostataka, idealni ligand bi bila molekula s dva anionska ili elektronegativna dijela, udaljena 5–6 veza jedna od druge. Jedna takva molekula je i CMPF (slike 2. i 3.B), koji se veže za HSA s visokim afinitetom iako je hidrofilna molekula (8, 15).

Prostranost i vezna svojstva ovog veznog mjesta se najbolje mogu vidjeti kad se preklape kristalografske strukture varfarina i CMPF-a (slika 5.). Može se primijetiti da se konformacija obližnjih aminokiselina ne razlikuje previše, dok se strukture i orijentacije varfarina i CMPF-a značajno razlikuju. Oba spoja se prostiru u različite dijelove veznog mjesta, dok je središnja planarna skupina u oba slučaja smještena u blizini Leu 238. To pokazuje kako se dva strukturno i prostorno vrlo različita liganda mogu vezati za isto vezno mjesto zahvaljujući njegovoj veličini.



Slika 5. Preklapljene strukture varfarina (plavo) i CMPF-a (žuto) vezanih za vezno mjesto u poddomeni IIA i aminokiseline s kojima dolaze u kontakt. Iako su ligandi prostorno vrlo različiti, vezno mjesto je dovoljno veliko da veže oba liganda bez značajnih promjena u konformaciji aminokiselinskih ostataka

Vezanje masnih kiselina također utječe na tercijarnu strukturu HSA (8) i vezanje liganada za to vezno mjesto (10, 28, 29). Kad se masna kiselina veže za FA2, postranični lanac Tyr 150 se premješta i ulazi u interakciju s karboksilnom skupinom masne

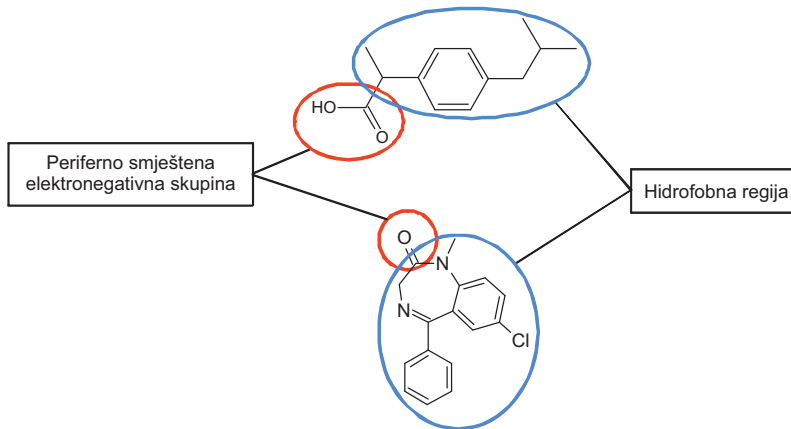
kiseline u FA2. Dolazi do konformacijskih promjena HSA i značajnog pregrupiranja ostalih aminokiselina, čime se povećava veličina i smanjuje polarnost unutarnje polarne skupine aminokiselina. Iako Tyr 150 ima središnju ulogu u vezanju lijekova kod HSA koji nema vezane masne kiseline, kad uđe u interakcije s masnom kiselinom u FA2 mjestu, njegovu ulogu nadomještaju drugi aminokiselinski ostaci (Lys 199, Arg 222, His 242, i u manjoj mjeri Arg 218 i Arg 257), zbog čega je vezno mjesto hidrofobnije, što može čak i povećati konstantu vezanja, npr. varfarina (8, 27). Kao što je već navedeno, prisutnost masnih kiselina utječe na orijentaciju oksifenbutazona, ali isto tako i na raspored aminokiselina u blizini indometacina (8). Pri višim koncentracijama masnih kiselina, vezanje liganada se smanjuje zbog izravne kompeticije s masnim kiselinama za vezno mjesto malog afiniteta (engl. *Low Affinity Site*, LAS) FA7 (27).

Vezno mjesto u poddomeni IIIA

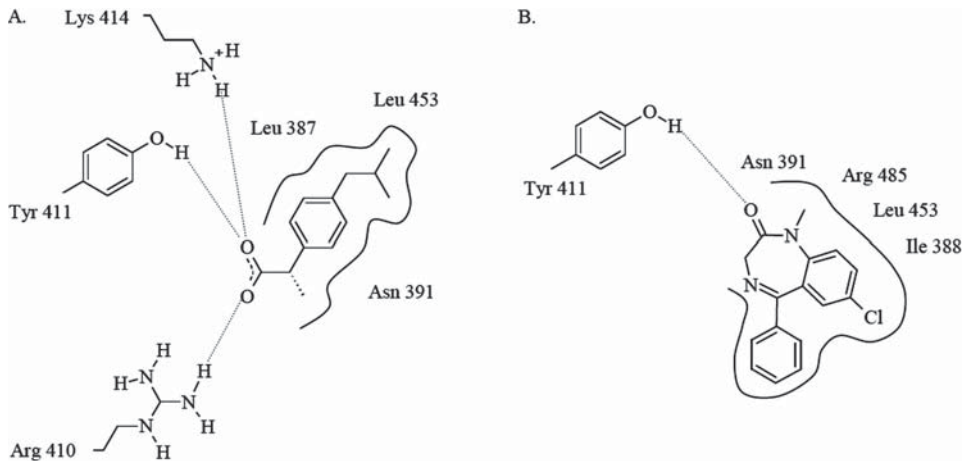
Vezno mjesto u poddomeni IIIA još se naziva i Sudlowljevo mjesto II (ili jednostavnije, vezno mjesto II), odnosno indol–benzodiazepinsko mjesto. Smješteno je u poddomeni IIIA i manje je i uže od veznog mjesta I, a također je i stereoselektivnije. Vezno mjesto II se sastoji od dugačke hidrofobne regije i polarnog dijela kojeg tvore tirozinski, argininski i serinski aminokiselinski ostaci. Zbog ovakve strukture je ovo vezno mjesto selektivno za karboksilne kiseline s negativno nabijenom kiselom skupinom na jednom kraju molekule s hidrofobnim centrom (npr. diflunisal i ibuprofen) (3, 8, 11). Pomoću QSAR studije, Wanwimolruk i sur. (30) su pokazali da se vezno mjesto II sastoji od hidrofobne šupljine duboke 16 Å i široke 8 Å s kationskom skupinom smještenom blizu površine. Negativni naboj nije nužan za vezanje sve dok je prisutno elektronegativno središte molekule, dok se pozitivno nabijeni ligandi ne vežu za ovo vezno mjesto (npr. benzodiazepini) (slike 6. i 7.) (30, 31). Zbog svoje manje veličine, ovo je vezno mjesto stereoselektivnije (npr. *R*-ibuprofen se veže 2,3 puta snažnije nego *S*-ibuprofen, a *L*-triptofan se veže otprilike 100 puta snažnije od *D*-triptofana) te još nije podijeljeno u pojedinačne dijelove kao vezno mjesto I (11). S obzirom na to da se vezno mjesto II preklapa s veznim mjestima visokog afiniteta FA3–FA4, veća je vjerojatnost da će se istiskivanje liganada koje uključuje masne kiseline i lijekove dogoditi na veznom mjesto II nego na veznom mjestu I, koje se preklapa s veznim mjestom niskog afiniteta FA7 (28,29)

Svojstva veznog mjesta u poddomeni IIIA

Kao i vezno mjesto I, vezno mjesto II je zapravo hidrofobna šupljina koja sadrži i polarne aminokiseline. Vezno mjesto II je strukturno slično veznom mjestu I, samo je manje: vezno mjesto II se sastoji od samo jednog hidrofobnog džepa, dok drugi džep nije prisutan zbog položaja Tyr 411, koji se nalazi na položaju koji odgovara Leu 219 u veznom mjestu I. Uz to, ulaz veznog mjesta II je više izložen otapalu, a nakupina polarnih aminokiselina (Arg 410, Lys 414 i Ser 489) nalazi se na jednoj strani



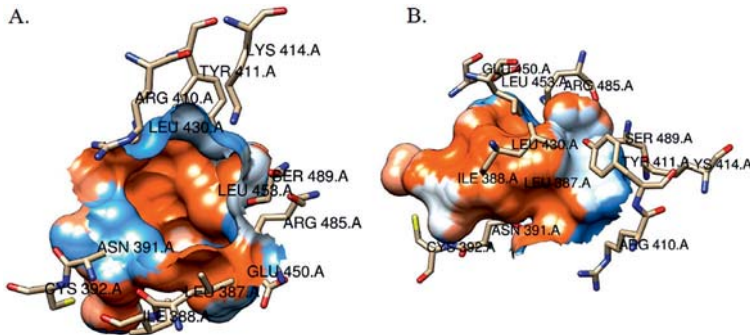
Slika 6. Strukturna svojstva ibuprofena (gore) i diazepama (dolje)



Slika 7. Interakcije između A. ibuprofena (PDB unos 2BXG) i B. diazepama (PDB unos 2BXF) s veznim mjestom II

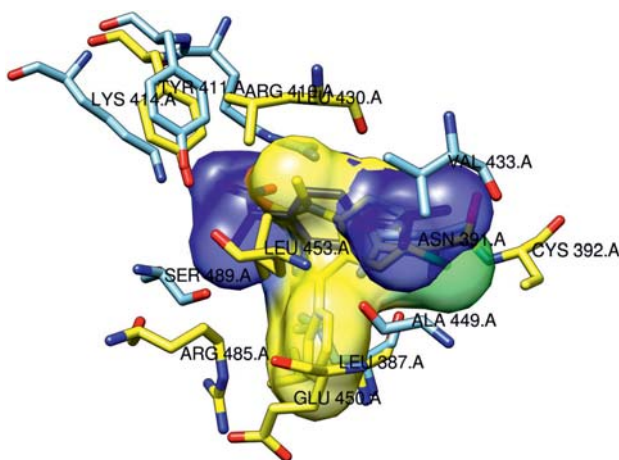
ulaza (slika 8.A). Ligandi ulaze u interakcije s hidroksilnom skupinom Tyr 411, polarnim aminokiselinama na ulazu i hidrofobnim džepom (slika 8.B), stoga je ovo vezno mjesto selektivno za lijekove s periferno smještenom elektronegativnom skupinom, poput diflunisala, diazepama i ibuprofena (8). S druge strane, određeni spojevi poput propofola, halotana i indoksil sulfata se vežu za karbonilni kisik Leu 430. U slučaju propofola, sterički utjecaji izopropilne skupine onemogućuju interakcije između jedine polarne hidroksilne skupine s polarnim dijelom veznog mjesta II. Umjesto toga, propofol se nalazi u konformaciji koja dozvoljava nastajanje vodikove veze s karbonilnim kisikom Leu 430 (32). Kao i vezno mjesto I, i vezno mjesto II je prilagodljivo i sposobno vezati velike, razgranate strukture kao što je diazepam, ali i veće

molekule poput tiroksina i dvije molekule masnih kiselina (FA3-FA4). U vezanju ovih molekula, prilagodljivost veznog mjesta dolazi do izražaja. Vezanje diazepama i masnih kiselina je popraćeno značajnim rotacijama postraničnih lanaca Leu 387 i Leu 453, i u slučaju diazepama s mogućim utjecajem molekula vode na daljnju prilagodbu veznog mjesta (8).



Slika 8. Vezno mjesto II: A. hidrofilni ulaz veznog mjesta s polarnim aminokiselinama Arg 410, Tyr 411, Lys 414 i Ser 489 koje su grupirane s jedne strane ulaza, B. bočni prikaz hidrofobnog dijela veznog džepa

Kao i u slučaju veznog mjesta I, različiti ligandi veznog mjesta II se mogu preklapati kako bi se pokazala njegova prilagodljivost i volumen (slika 9.). U ovom slučaju, kristalografske strukture ibuprofena i diazepama su preklapljene. Može se vidjeti da oba liganda dijele veći dio veznog mjesta, a iznimke su dodatni volumen potreban za fenilni prsten diazepama koji uzrokuje značajnu promjenu u orijentaciji Leu 387 i



Slika 9. Preklapljene strukture ibuprofena (plavo) i diazepama (žuto) vezanih na vezno mjesto II. Središnji dijelovi molekula se značajno preklapaju, dok se za uklapanje fenilnog prstena diazepama Leu 387 mora reorijentirati, a u slučaju karboksilne skupine ibuprofena položaj Tyr 411 je značajno promijenjen

karboksilna skupina ibuprofena koja uzrokuje promjene u orijentaciji Tyr 411. Može se zaključiti da se za oba vezna mjesta mogu vezati različiti ligandi, ali zbog svoje veličine, za vezno mjesto I se mogu vezati raznovrsniji ligandi, neki također i istovremeno i s manje potrebnih konformacijskih promjena proteina.

Vezno mjesto u poddomeni IB

Vezno mjesto u poddomeni IB je prepoznato kao primarno i sekundarno vezno mjesto brojnih spojeva (33). Uz činjenicu da se na ovo vezno mjesto primarno vežu endogeni spojevi poput bilirubina i hemina (3), ovdje se primarno vežu i spojevi poput lidokaina (34) i fusidične kiseline (antibiotik steroidne strukture) (12), kao i razni drugi lijekovi kojima je ovo primarno ili sekundarno vezno mjesto (3, 24).

Ostala vezna mjesta

Cys 34 u dubini poddomene IA je jedini cisteinski ostatak koji ne tvori unutar-molekulski disulfidni most. Stoga ovaj cisteinski ostatak može za sebe vezati određene lijekove i s njima tvoriti kovalentne veze (npr. s derivatima bukilamina, *D*-penicilamina, kaptoprila i etakrinske kiseline) (3, 11), a može i vezati te razgraditi disulfiram u dvije molekule dietilditiokarbamata (35). Ovo vezno mjesto je također vrlo selektivno za ione metala (npr. Au(I), Pt(II), Ag(I), Hg(II)), kao i lijekove koji sadrže ove metale (npr. auranofin, cisplatin) (3, 11). Postoje i dodatna vezna mjesta za metale; jedno se nalazi na *N*-kraju HSA i naziva se *N*-terminalno mjesto (engl. *N-Terminal Site*, NTS). Za to se vezno mjesto vežu Cu(II), Co(II) i Ni(II). Još jedno važno mjesto za vezanje metala je multimetalno vezno mjesto ili kadmijsko mjesto A (engl. *Multi-metal Binding Site A*, MBS-A) i primarno je vezno mjesto za Cd(II) i Zn(II). Osim navedenih veznih mjesta, postoji još nekoliko veznih mjesta na koja se mogu vezati različiti spojevi. Primjeri takvih liganada su oksifenbutazon, propofol, jodopamid, diflunisal, halotan, ibuprofen itd. (8). Identificirana su vezna mjesta u svim poddomenama na koja se veže samo nekoliko spojeva (3, 11). Popis kristalografskih struktura HSA s vezanim ligandima se može naći u radu Fanali i sur. (3).

Ponovno vezanje istisnutih lijekova

U određenim slučajevima, istisnuti se lijek može ponovno vezati na drugo vezno mjesto te tako koncentracija slobodnog lijeka može biti niža od očekivane. Takvi slučajevi su najbolje opisani kod određenih nesteroidnih protuupalnih lijekova (36, 37). U slučaju diklofenaka i ibuprofena, Yamasaki i sur. su pokazali *in vitro* istiskivanje s veznog mjesta II na vezno mjesto I diklofenaka pomoću ibuprofena. Diklofenak se primarno veže za vezno mjesto II, kao i ibuprofen. U prisutnosti ibuprofena, diklofenak je istisnut s veznog mjesta II, ali se ponovno veže na vezno mjesto I, što dovodi do mnogo niže slobodne koncentracije diklofenaka nego što bi se očekivalo da je u pitanju samo kompetitivna interakcija (36). Za istiskivanje s veznog mjesta II na vezno mjesto I se također pokazalo da je stereoselektivno, kao u slučaju karprofena, s najjačim interakcijama između *S*(+)-karprofena i *S*(+)-ibuprofena (37).

(Pseudo)enzimatska svojstva HSA

Uz vezanje liganada na HSA, pokazalo se da HSA određene spojeve i kemijski modificira, odnosno da HSA ima i određena enzimatska svojstva. Neka od tih svojstava su enolazna aktivnost prema dihidrotestosteronu, tioesterazna aktivnost prema disulfiramu, dehidracijska aktivnost prema prostaglandinu D2 i dehidracijska i potom izomerizacijska aktivnost prema 15-keto-prostaglandinu E2 (reakcije koje uključuju prostaglandine mogu biti inhibirane fenilbutazonom i varfarinom) (11). Također, enzimatska aktivnost HSA može biti stereoselektivna (38), npr. vezno mjesto I može degradirati sulbenicilin, pri čemu je selektivnije prema *R*-izomeru (39). Isto tako, i vezno mjesto I i vezno mjesto II imaju esteraznu aktivnost (11, 40, 41), kao i hidrolaznu aktivnost za glukuronide lijekova, pri čemu kataliziraju transformaciju acil glukuronida u početne spojeve, ali isto tako mogu dovesti i do kovalentnog vezanja lijekova na HSA i njihove toksičnosti (3, 11, 42, 43). Esterazna aktivnost HSA može poslužiti i za aktivaciju prolijekova (11). Na taj način HSA može utjecati na ukupnu i slobodnu koncentraciju lijekova, kao i na njihov metabolizam, odnosno može imati utjecaj na farmakokinetiku lijekova (40).

Klinički značajno istiskivanje lijekova s HSA

Budući da je koncentracija HSA u krvnoj plazmi puno viša od koncentracije većine lijekova, a i vezna mjesta na HSA su velika i prilagodljiva te u određenim slučajevima na sebe mogu istodobno vezati i više liganada, vjerojatnost istiskivanja lijek–lijek je vrlo mala. No, takve se interakcije ne smiju olako odbaciti kao klinički neznčajne, iako su rijetke. Najbolje opisani primjeri su interakcije između varfarina i klofibrata (3) te varfarina i kloral hidrata (44). Isto tako, opisane su i interakcije između ceftriaksona i probenacida (45), valproata i fenitoina s acetilsalicilnom kiselinom (46), fenitoina s antibioticima (47) i dr.

S druge strane, mnogo su češće interakcije lijekova s fiziološkim ligandima HSA, naročito s masnim kiselinama. Masne kiseline su visoko zastupljene u svakodnevnoj prehrani, mogu se pronaći u visokim koncentracijama u tijelu, imaju više veznih mjesta na HSA i mogu utjecati na vezanje drugih liganada i izravno i alosterički (3, 9, 48–53). Vezanje masnih kiselina uglavnom dovodi do smanjenog vezanja lijekova, kao što su tiamilal, diazepam, furosemid, ibuprofen, flurbiprofen i steroidi (10, 11, 54), dok se u slučaju bilirubina i liganada koji se vežu za vezno mjesto hema njihovo vezanje povećava (10, 28). Povećano vezanje hema za HSA (primjerice u slučaju hemolitičke anemije ili rabdomiolize) snižava konstantu vezanja liganada za vezno mjesto I. Isto tako, plazmatska koncentracija hem-Fe(III) može biti povećana uslijed povećane koncentracije liganada koji se vežu za vezno mjesto I (55–57). Bilirubin također ulazi u interakcije istiskivanja s brojnim lijekovima, npr. valproat, ceftriakson, sulfonamidi, oksifenbutazon, fenilbutazon, sulfnpirazon, ketofenilbutazon, glibenclamid, tolbutamid, varfarin, salicilat i furosemid (11, 58). Preporuka je da se ti lijekovi ne daju novorođenčadi koja je u opasnosti od kernikterusa te se također preporučuje da se svi lijekovi koji se koriste kod novorođenčadi ispitaju na sposobnost istiskivanja bilirubina (11).

Lijekovi također mogu ulaziti u interakcije istiskivanja i s patofiziološkim ligandima, primjerice pri smanjenju funkcije ili zatajanju jetre ili bubrega. Takvi ligandi su primjerice indoksil sulfat, indol-3-acetat, hipurna kiselina i CMPF, koji se u tijelu mogu nalaziti u značajnim koncentracijama (11, 54, 59–61). U tim će slučajevima doći do smanjenja sveukupnog kapaciteta HSA za vezanje lijekova te će se tako povećati njihova slobodna koncentracija, što će posljedično najčešće dovesti do njihovog bržeg izlučivanja, ali moguće i do nuspojava uzrokovanih trenutno povišenim koncentracijama slobodnog lijeka u krvi.

Zahvala

Ovaj je rad objavljen u okviru projekta *Metabolizam i interakcije biološki aktivnih spojeva i QSAR* kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2014-09-5704.

Human serum albumin – the most important transport protein in the blood

H. Rimac, M. Bojić

Abstract

Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein in human serum. It has numerous functions, one of which is transport of small hydrophobic molecules, such as metabolites, hormones, and nutrients, as well as drugs and toxins. This promiscuous, nonspecific affinity can lead to competition and displacement of different ligand in binding to HSA and cause increase in toxicity of displaced ligands. In this paper, the most important HSA binding sites are described and the risk of displacement interactions between different ligands is discussed. While such interactions are more common between physiological (*e.g.* fatty acids, bilirubin, heme etc) and pathological ligands (*e.g.* indoxyl sulfate, indol-3-acetate, hypuric acid, and CMPF) and drugs, displacement interactions between drugs are also known. In certain cases these interactions can directly influence drug's free, active concentration in blood.

1. Peters T. Metabolism: Albumin in the Body. U: All about Albumin. San Diego: Academic Press; 1996; 188–250.
2. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. Nature. 1992; 358:209–215.
3. Fanali G, Di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. Mol Aspects Med. 2012; 33:209–290.
4. Peters T. The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties. U: All about Albumin. San Diego: Academic Press; 1996. 9–75.
5. Peters T. Ligand Binding by Albumin. U: All about Albumin. San Diego: Academic Press; 1996; 76–132.

6. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1975; 11:824–832.
7. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further Characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1976; 12:1052–1061.
8. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol.* 2005; 353:38–52.
9. Curry S, Brick P, Franks NP. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1441:131–140.
10. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev.* 1981; 33:17–53.
11. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25:695–704.
12. Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S. Crystallographic Analysis of Human Serum Albumin Complexed with 4Z,15E-Bilirubin-IX α . *J Mol Biol.* 2008; 381:394–406.
13. Ha C-E, Bhagavan N V. Novel insights into the pleiotropic effects of human serum albumin in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830:5486–5493.
14. Scottolini AG, Bhagavan N V., Oshiro T, Powers L. Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia: a study of four probands and the kindred of three. *Clin Chem.* 1984; 30:1179–1181.
15. Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: A new approach. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64:1355–1374.
16. Benet LZ, Hoener B-A. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 71: 115–121.
17. Hochman J, Tang C, Prueksaritanont T. Drug-drug interactions related to altered absorption and plasma protein binding: Theoretical and regulatory considerations, and an industry perspective. *J Pharm Sci.* 2015; 104:916–929.
18. Lexa KW, Dolgih E, Jacobson MP. A structure-based model for predicting serum albumin binding. *PLoS One.* 2014; 9:e93323.
19. Dasgupta A. Usefulness of monitoring free (unbound) concentrations of therapeutic drugs in patient management. *Clin Chim Acta.* 2007; 377:1–13.
20. Zhang F, Xue J, Shao J, Jia L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov Today.* 2012; 17:475–485.
21. Fehske KJ, Müller WE, Wollert U. The location of drug binding sites in human serum albumin. *Biochem Pharmacol.* 1981; 30:687–692.
22. Fehske KJ, Schläfer U, Wollert U, Müller WE. Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone. *Mol Pharmacol.* 1982; 21:387–393.
23. Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim Biophys Acta – Protein Struct Mol Enzymol.* 1996; 1295:147–157.
24. Zhu L, Yang F, Chen L, Meehan EJ, Huang M. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography. *J Struct Biol.* 2008; 162:40–49.
25. Tawara S, Matsumoto S, Matsumoto Y, Kamimura T, Goto S. Structure-binding relationship and binding sites of cephalosporins in human serum albumin. *J Antibiot (Tokyo).* 1992; 45:1346–1357.
26. Wang Y, Yu H, Shi X, Luo Z, Lin D, Huang M. Structural mechanism of ring-opening reaction of glucose by human serum albumin. *J Biol Chem.* 2013; 288:15980–15987.

27. Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M, Curry S. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin. Anatomy of drug site I. *J Biol Chem.* 2001; 276:22804–22809.
28. Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, Curry S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J Mol Biol.* 2006; 361:336–351.
29. Ryan AJ, Ghuman J, Zunszain PA, Chung C, Curry S. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. *J Struct Biol.* 2011; 174:84–91.
30. Wanwimolruk S, Birkett DJ, Brooks PM. Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1983; 24:458–463.
31. Maruyama K, Nishigori H, Iwatsuru M. Characterization of the benzodiazepine binding site (diazepam site) on human serum albumin. *Chem Pharm Bull.* 1985; 33:5002–5012.
32. Bhattacharya AA, Curry S, Franks NP. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin: High resolution crystal structures. *J Biol Chem.* 2000; 275:38731–38738.
33. Zsila F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: Toward the three-sites model. *Mol Pharm.* 2013; 10:1668–1682.
34. Hein KL, Kragh-Hansen U, Morth JP, Jeppesen MD, Otzen D, Møller J V., et al. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *J Struct Biol.* 2010; 171:353–360.
35. Agarwal RP, Phillips M, McPherson RA, Hensley P. Serum albumin and the metabolism of disulfiram. *Biochem Pharmacol.* 1986; 35:3341–3347.
36. Yamasaki K, Rahman MH, Tsutsumi Y, Maruyama T, Ahmed S, Kragh-Hansen U, et al. Circular dichroism simulation shows a site-II-to-site-I displacement of human serum albumin-bound diclofenac by ibuprofen. *AAPS PharmSciTech.* 2000; 1:12.
37. Rahman MH, Maruyama T, Okada T, Imai T, Otagiri M. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin-II. Stereoselective site-to-site displacement of carprofen by ibuprofen. *Biochem Pharmacol.* 1993; 46:1733–1740.
38. Schmidt S, Gonzales D, Derendorf H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci.* 2010; 99:1107–1122.
39. Tsuda Y, Tsunoi T, Watanabe N, Ishida M, Yamada H, Itoh T. Stereoselective binding and degradation of sulbenicillin in the presence of human serum albumin. *Chirality.* 2001; 13:236–243.
40. Moradi N, Ashrafi-Kooshk MR, Ghobadi S, Shahlai M, Khodarahmi R. Spectroscopic study of drug-binding characteristics of unmodified and pNPA-based acetylated human serum albumin: Does esterase activity affect microenvironment of drug binding sites on the protein? *J Lumin.* 2015; 160:351–361.
41. Yang F, Bian C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Huang M. Effect of human serum albumin on drug metabolism: Structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J Struct Biol.* 2007; 157:348–355.
42. Williams AM, Dickinson RG. Studies on the reactivity of acyl glucuronides-VII: Modulation of reversible and covalent interaction of diflunisal acyl glucuronide and its isomers with human plasma protein in vitro. *Biochem Pharmacol.* 1994; 47:457–467.
43. Dubois N, Lopicque F, Maurice M-H, Pritchard M, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, et al. In vitro irreversible binding of ketoprofen glucuronide to plasma protein. *Am Soc Pharmacol Exp Ther.* 1993; 21:617–623.
44. Sellers EM, Koch-Weser J. Kinetics and clinical importance of displacement of warfarin from albumin by acidic drugs. *Ann N Y Acad Sci.* 1971; 179:213–225.

45. Stoeckel K, Trueb V, Dubach UC, McNamara PJ. Effect of probenecid on the elimination and protein binding of ceftriaxone. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988; 34:151–156.
46. Sandson NB, Marcucci C, Bourke DL, Smith-Lamacchia R. An interaction between aspirin and valproate: The relevance of plasma protein displacement drug-drug interactions. *Am J Psychiatry.* 2006; 163:1891–1896.
47. Dasgupta A, Dennen DA, Dean R, McLawhon RW. Displacement of phenytoin from serum protein carriers by antibiotics: studies with ceftriaxone, nafcillin, and sulfamethoxazole. *Clin Chem.* 1991; 37:98–100.
48. Chuang VTG, Otagiri M. How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin? *Pharm Res.* 2002; 19:1458–1464.
49. Vial Y, Tod M, Hornecker M, Urien S, Conti F, Dauphin A, et al. In vitro influence of fatty acids and bilirubin on binding of mycophenolic acid to human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54:607–609.
50. Vorum H, Honoré B. Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. *J Pharm Pharmacol.* 1996; 48:870–875.
51. Noctor TAG, Wainer IW, Hage DS. Allosteric and competitive displacement of drugs from human serum albumin by octanoic acid, as revealed by high-performance liquid affinity chromatography, on a human serum albumin-based stationary phase. *J Chromatogr Biomed Appl.* 1992; 577:305–315.
52. Bojko B, Sułkowska A, Maciazek-Jurczyk M, Równicka J, Sułkowski WW. Influence of myristic acid on furosemide binding to bovine serum albumin. Comparison with furosemide-human serum albumin complex. *Spectrochim Acta – Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2010; 76:6–11.
53. Bojko B, Sułkowska A, Maciazek-Jurczyk M, Równicka J, Pentak D, Sułkowski WW. Alterations of furosemide binding to serum albumin induced by increased level of fatty acid. *J Pharm Biomed Anal.* 2010; 51:273–277.
54. Vallner JJ. Binding of drugs by albumin and plasma protein. *J Pharm Sci.* 1977; 66:447–465.
55. Ascenzi P, Bocedi A, Notari S, Menegatti E, Fasano M. Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site I. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334:481–486.
56. Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life.* 2005; 57:787–96.
57. Ascenzi P, Fasano M. Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin. *Biophys Chem.* 2010; 148:16–22.
58. Maruyama K, Harada S, Nishigori H, Iwatsuru. Classification of drugs on the basis of bilirubin-displacing effect on human serum albumin. *Chem Pharm Bull.* 1984; 32:2414–2420.
59. Yamasaki K, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta – Gen Subj.* 2013; 1830:5435–5443.
60. Grainger-Rousseau T-J, McElnay JC, Collier PS. The influence of disease on plasma protein binding of drugs. *Int J Pharm.* 1989; 54:1–13.
61. Gugler R, Mueller G. Plasma protein binding of valproic acid in healthy subjects and in patients with renal disease. *Br J Clin Pharmacol.* 1978; 5:441–446.

Primljeno 4. srpnja 2017.