

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Sérový albumin a jeho mezimolekulové interakce

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Martina Bednářová

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: prof. Ing. Jan Vacek, Ph. D.

Olomouc 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Práce ani její část nebyla předložena k získání stejného či jiného akademického titulu.

Zároveň souhlasím se zpřístupněním mé závěrečné práce v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 20. 5. 2019

.....

Podpis

Podíl autorky a poděkování

Jako autorka této práce jsem provedla vizualizace v programu PyMol a základní elektrochemické a elektroforetické analýzy ve čtyřech opakováních zcela samostatně. Vzhledem k náročnosti interakčních experimentů jsem se na jejich realizaci a vyhodnocení výsledků podílela částečně, odhadem z 50 %.

Za pomoc s vypracováním a zpřístupnění prostor a materiálů k vytvoření bakalářské práce chci tímto poděkovat především vedoucímu mé práce prof. Ing. Janu Vackovi, Ph.D. Dále velice děkuji členům výzkumného týmu na Ústavu lékařské chemie a biochemie, paní doktorce Martině Zatloukalové, panu Mgr. Davidu Novákovi a paní laborantce Zitě Školařové za ochotu, trpělivost a přátelskou atmosféru v průběhu tvorby této práce. Za poskytnutí vzorků kyseliny nitroolejové děkuji pracovní skupině prof. Dr. Bruce Freemana (University of Pittsburgh, USA).

Bibliografická informace

Jméno a příjmení autora: Martina Bednářová

Název práce: Sérový albumin a jeho mezimolekulové interakce

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra organické chemie (experimenty byly provedeny na Ústavu lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta)

Vedoucí práce: prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2019

Abstrakt:

Lidský sérový albumin je globulární protein a integrální komponenta krve. Protein participuje na transportu širokého spektra nízkomolekulárních ligandů a je tudíž žádoucí vyvíjet nové metodické postupy vhodné pro analýzu jeho mezimolekulových interakcí. Nitrované deriváty mastných kyselin jsou relativně novým předmětem výzkumu a kyselina nitroolejová je potenciálním kandidátem na léčivo díky její účasti na protizánětlivých procesech. Cílem bakalářské práce je zkoumat interakce albuminu s kyselinou olejovou a jejím substitučním derivátem, kyselinou nitroolejovou elektrochemickými a elektroforetickými postupy. Získané výsledky odhalily vazebnou kapacitu albuminu pro kyselinu nitroolejovou, vyjádřenou v molárním poměru 7:1 (kyselina:protein). Dále výsledky neprokázaly žádnou tvorbu agregátů a fragmentů vlivem této interakce. Tyto výsledky mohou být počátkem dalšího zkoumání transportních vlastností sérového albuminu a vyvíjení dalších postupů pro studium významu nitrovaných derivátů mastných kyselin.

Klíčová slova: lidský sérový albumin, kyselina nitroolejová, struktura proteinů, metody analýzy proteinů, vazba léčiv, modifikované mastné kyseliny

Počet stran: 49

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Martina Bednářová

Title: Serum albumin and its intermolecular interactions

Type of thesis: Bachelor's

Department: Department of Organic Chemistry (the experiments were realized at the Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine)

Advisor: prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract:

Human serum albumin is a globular protein and an integral component of blood. The protein participates in the transport of a wide range of low-molecular-weight ligands and therefore it is desirable to develop new methodologies suitable for the analysis of its intermolecular interactions. Nitrated fatty acid derivatives are a relatively new object of research and nitrooleic acid is a potential drug candidate, because of its participation in anti-inflammatory processes. The aim of this thesis is to investigate the interaction of albumin with oleic acid and its substitution derivative nitrooleic acid, by electrochemical and electrophoretic methods. The obtained results revealed the binding capacity of albumin for nitrooleic acid expressed in molar ratio 7:1 (acid:protein). The results also showed that no aggregates and fragments of human serum albumin are formed due to the interaction with nitrooleic acid. These results may be the starting point for further investigations of the transport properties of serum albumin and the development of other methods for studying the importance of nitrated fatty acid derivatives.

Keywords: human serum albumin, nitrooleic acid, protein structure, methods for analysis of proteins, drug binding, modified fatty acids

Number of pages: 49

Number of appendixes: 0

Language: czech

Seznam zkratek

AK	aminokyselina (aminokyseliny)
BMI	„Body mass index“ = index tělesné hmotnosti
BSA	hovězí sérový albumin
ER	endoplazmatické retikulum
FA	mastná kyselina (FAs - mastné kyseliny)
gHSA	glykovaný lidský sérový albumin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSA	lidský sérový albumin
ID-MS	izotopová diluční hmotnostní spektrometrie
IEC	iontově výměnná chromatografie
IEM	iontově výměnná membránová chromatografie
IR	infračervená spektroskopie
Keap1-Nrf2	regulační dráha s ústřední rolí ochrany buněk před oxidačním stresem
LC	kapalinová chromatografie
NF- κ B	nukleární faktor kappa B - skupina transkripčních faktorů, které se vážou na promotory RNA polymerázy II a ovlivňují tak expresi genů důležitých pro imunitu, zánětlivou odpověď a další významné procesy
NIR	blízká infračervená oblast spektra
NO ₂ -FA	nitrované mastné kyseliny
NO ₂ -OA	kyselina nitroolejová
OA	kyselina olejová
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PEG	polyethylenglykol

P _{NBN}	kopolymer složený z N-methylolakrylamidu, butylakrylátu a N-izopropylakrylamidu
PPAR γ	nitrojaderné receptory ovlivňující transkripci a expresi genů
SDS	dodecylsírán sodný
SEC	vylučovací chromatografie
TCA	kyselina trichloroctová
TLR4	„Toll-like“ receptor 4 - skupina bílkovinných receptorů na povrchu cytoplazmatických membrán, schopných rozeznávat cizí, a tedy potenciálně nebezpečné molekuly

Obsah

1. Úvod	10
2. Cíle práce	11
3. Teoretická část	12
3. 1. Lidský sérový albumin	12
3. 1. 1. Historie	12
3. 1. 2. Biosyntéza albuminu	12
3. 1. 3. Struktura albuminu	13
3. 1. 4. Fyzikálně-chemické vlastnosti albuminu	15
3. 1. 5. Funkce albuminu	15
3. 1. 6. Posttranslační modifikace albuminu	17
3. 1. 7. Hypoalbuminémie	19
3. 1. 8. Analbuminémie	19
3. 1. 9. Albuminurie	20
3. 2. Mastné kyseliny	20
3. 2. 1. Interakce sérového albuminu s mastnými kyselinami	20
3. 2. 2. Nitrované mastné kyseliny	22
3. 3. Metody izolace albuminu	23
3. 3. 1. Cohnova metoda	23
3. 3. 2. Kombinace Cohnovy metody a kapalinové chromatografie	24
3. 3. 3. Izolace z placenty	24
3. 3. 4. Afinitní srážení HSA za použití kopolymeru P _{NBN} a L-thyroxinu	24
3. 3. 5. Metoda srážení za zvýšené teploty	24
3. 3. 6. Precipitace síranem amonným v kombinaci s LC	24
3. 3. 7. Precipitace směsí TCA/aceton	25
3. 3. 8. Iontově výměnná chromatografie	25
3. 3. 9. Vylučovací chromatografie	26
3. 3. 10. Afinitní chromatografie s použitím barviva jako ligandu	26
3. 3. 11. Imunoafinitní chromatografie (IAC)	27
3. 4. Metody detekce albuminu	27
3. 4. 1. Elektroforéza	27
3. 4. 2. Elektrochemické metody	27
3. 4. 3. Spektrofotometrické metody	28
3. 4. 4. Imunochemické metody	29
3. 4. 5. LC/MS	29

4. Experimentální část	30
4. 1. Materiál a chemikálie	30
4. 1. 1. Chemikálie	30
4. 1. 2. Roztoky	30
4. 1. 3. Přístrojové vybavení.....	31
4. 2. Metody	32
4. 2. 1. Vizualizace struktury HSA	32
4. 2. 2. Elektrochemie	32
4. 2. 3. Gelová elektroforéza	33
5. Výsledky.....	34
6. Diskuse a závěr.....	40
7. Seznam citací.....	43

1. Úvod

Řada sloučenin, zvláště hydrofobní povahy, využívá kvůli své nízké rozpustnosti v plazmě specifické transportéry, aby byly efektivně dopraveny na potřebné místo. Přenos pomocí transportérů je také důležitý, pokud dané látky mohou ve volné formě v krvi způsobit nežádoucí účinky. Jedním z nejvýznamnějších sérových proteinů, plnících tuto úlohu, je sérový albumin.

Albumin je globulární protein zodpovídající za regulaci onkotického tlaku v krvi, antioxidační a protizánětlivé účinky, vazbu léčiv nebo zmíněný transport. Tato bakalářská práce se zaměřuje na interakce sérového albuminu s mastnými kyselinami a jejich substitučními deriváty, konkrétně jde o kyselinu olejovou a nitroolejovou. Kyselina nitroolejová se dá považovat za poměrně nově studovanou sloučeninu s protizánětlivým účinkem.

Teoretická část této práce je tvořena rešerší publikací o lidském sérovém albuminu se zřetelem na jeho strukturu, funkce a strukturální modifikace, izolační a detekční metody. V druhé části literárního přehledu jsou popsány mastné kyseliny, tj. vazebná místa v molekule albuminu pro mastné kyseliny, a poté jsou popsány dosud odhalené vlastnosti a účinky nitrovaných derivátů mastných kyselin.

Praktická část obsahuje výsledky elektrochemických a elektroforetických experimentů, kterými byla studována interakce lidského sérového albuminu s kyselinou nitroolejovou, a v závěru této práce se nachází diskuse o výsledcích a shrnutí celé bakalářské práce.

2. Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na lidský sérový albumin a jeho funkční vlastnosti se zřetelem na jeho strukturní modifikace a transport mastných kyselin.
2. Elektrochemickými metodami analyzovat interakce albuminu s kyselinou olejovou a nitroolejovou a stanovit vazebnou kapacitu albuminu pro kyselinu nitroolejovou.
3. Elektroforetickými metodami ověřit validitu použitého albuminu a separovat albumin po inkubaci se zmíněnými mastnými kyselinami, případně odhalit agregáty či fragmenty, vznikající vlivem interakce s kyselinou nitroolejovou.

3. Teoretická část

3.1. Lidský sérový albumin

Lidský sérový albumin (HSA, tj. „Human Serum Albumin“) patří mezi významné multifunkční proteiny obsažené v intravaskulárním prostoru. Přívlastek multifunkční vypovídá o jeho pestré škále funkcí, z nichž tou hlavní je transport různých endo- i exogenních látek, jako jsou léčiva, hormony, steroidy, ionty kovů, kyslík, oxid dusnatý, mastné kyseliny a další.¹

Koncentrace sérového albuminu v krvi se u zdravých jedinců pohybuje kolem 500-800 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace v moči je menší než 0,3 $\mu\text{mol/l}$. Jakmile množství albuminu v moči stoupne, značí to výskyt zánětu močových cest nebo poškození ledvin.²

HSA se podává až po 10 g dávkách v případech, které jsou asociovány hypoalbuminemií, tj. hemoragický šok, chirurgická ztráta krve, onemocnění jater nebo vážné popáleniny. Záměrně se aplikuje pacientům pro vyrovnání osmotického tlaku v plazmě.³

3.1.1. Historie

Význam sérového albuminu vzrostl během druhé světové války, kdy jej chirurg Isidor S. Ravdin klinicky využil a podával sedmi pacientům vážně poraněným při útoku na Pearl Harbor. Stav všech sedmi pacientů se díky tomu zlepšil.⁴ V dalších letech se zkoumala struktura albuminu, např. v roce 1975 došlo k identifikaci primární sekvence. V roce 1989 jsme díky Cartrovi a spolupracovníkům získali 3D strukturu HSA s rozlišením 6,0 Å. Podrobně popsany 3D model v rozlišení 2,8 Å vznikl v roce 1992 s využitím rentgenové krystalografie.⁵

3.1.2. Biosyntéza albuminu

K biosyntéze albuminu dochází v játrech. Prekurzor zvaný proalbumin je nejprve vytvářen ve formě preproalbuminu v lumenu endoplazmatického retikula (ER) hepatocytů. Za vznik prekurzoru zodpovídá jediný gen. Následně dochází ke štěpení na ER.⁵ Po odštěpení 6 aminokyselin dlouhého peptidu z N-konce putuje „zralý“ albumin do krevního oběhu, a to v koncentraci 10-15 g/den.⁶

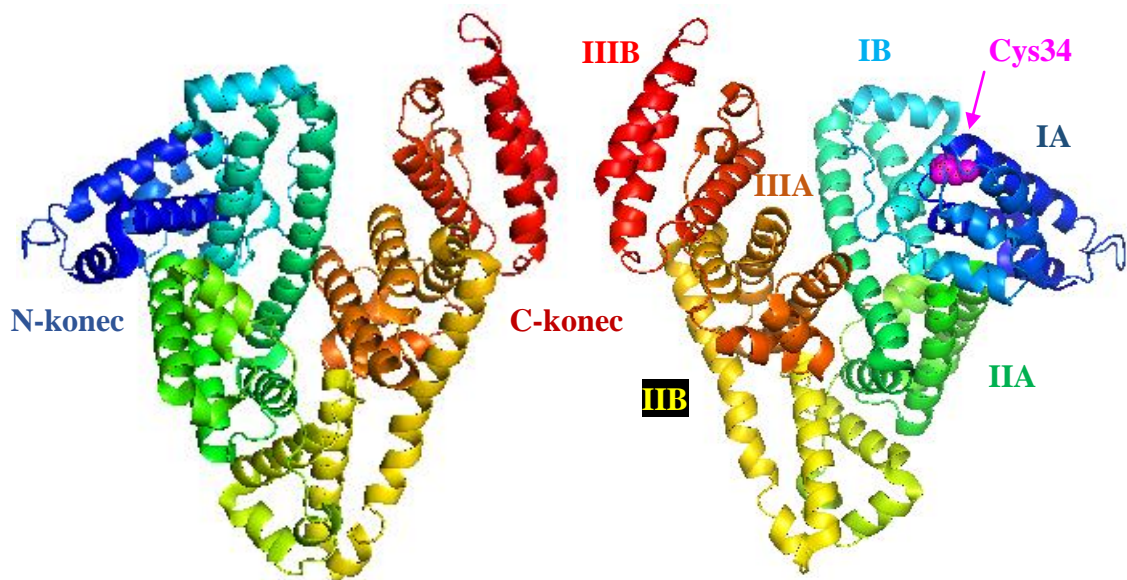
K degradaci dochází např. ve svalech, kůži, játrech nebo ledvinách.⁶

3. 1. 3. Struktura albuminu

Polypeptidový řetězec globulárního albuminu zahrnuje celkem 585 aminokyselin (AK).⁷ Tyto AK jsou součástí tří domén označených římskými číslicemi I (zbytky 1-195), II (zbytky 196-383) a III (zbytky 384-585), které se dále dělí na subdomény A a B (obr. č. 1). Konkrétně se objevuje 17 tyrosilových zbytků, 35 cysteinylových zbytků, z nichž 34 tvoří disulfidické můstky, a jeden tryptofan - Trp214. Ten se nachází v hydrofobní štěrbině v subdoméně IIA.⁶ Jediný volný cysteinylový zbytek, značený jako Cys34, zastupuje téměř 80 % všech thiolových skupin v plazmě a ve struktuře albuminu má význam zejména v interakcích s dalšími látkami (obr. č. 1). Díky jeho lokalizaci na řetězci v subdoméně IA hraje důležitou roli ve vazbě léčiv.¹

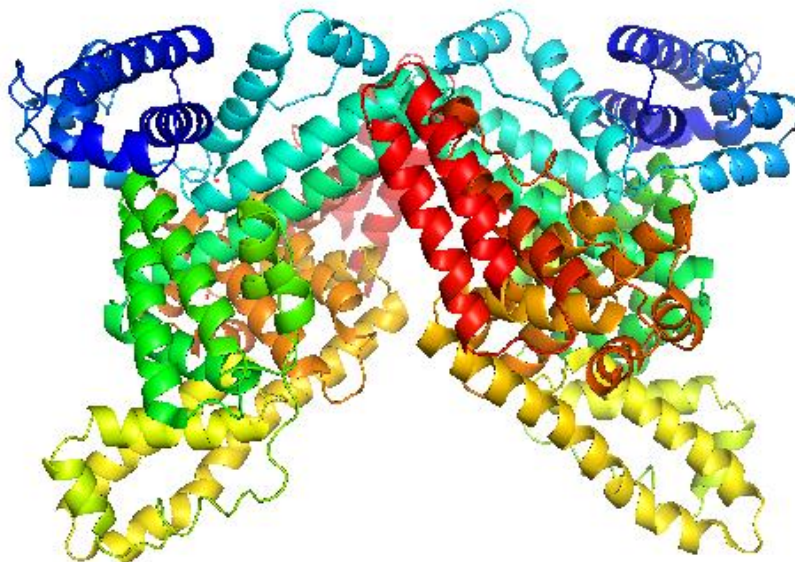
Co se týče sekundární struktury, okolo 69 % sestává z α -helixů (v každé doméně deset⁸) a 23 % z β -skládaných listů.⁹ Jednotlivé subdomény jsou spojené dlouhými smyčkami a dva dlouhé stočené α -helixy spojují subdomény IB s IIA a IIB s IIIA (obr. č. 1).⁸

V krystalické formě zaujímá albumin převážně „srdcovitý“ tvar, v roztoku je molekula ale poměrně flexibilní.¹⁰ Například při kolísání pH vykazuje albumin konformační změny. Při pH menším než 2,7 zaujímá prodlouženou (E) konformaci. V rozmezí pH 2,7 až 4,3 je to (F) forma charakteristická zvýšenou viskozitou, menší rozpustností a menším počtem α -helixů vzhledem k neutrální (N) konformaci („srdcovitý“ tvar), kterou HSA zaujímá při pH 4,3 až 8,0. Nad pH 8,0 má HSA bazickou konformaci bez α -helixů se zvýšenou afinitou k některým ligandům oproti klasické formě.¹¹ Deformace mohou způsobit také vazby mastných kyselin (FA) nebo přítomnost vápníku a dalších iontů v okolí molekuly.¹²



Obr. č. 1: 3D struktura HSA s barevně odlišenými subdoménami, konci řetězce a poloha Cys34 (růžová) v programu PyMol (PDB kód: 1E78).¹³

Sérový albumin přirozeně agreguje - jednotlivé molekuly se spojují v dimery, trimery či tetramery (obr. č. 2). Náchylnost k agregaci je závislá na okolních podmínkách a stavu organismu. Např. u pacientů s onemocněním jater (cirhóza, akutní chronické selhání jater) se vyskytuje vyšší koncentrace dimerů albuminu než u zdravých jedinců. Tvorbu multimerních forem mohou spustit i některé ionty kovů.¹⁴



Obr. č. 2: 3D struktura dimeru HSA v programu PyMol (PDB kód: 1A06).¹⁵

3. 1. 4. Fyzikálně-chemické vlastnosti albuminu

Molekulová hmotnost HSA je 66 438 Da. ¹ Velký počet ionizovaných AK zbytků (až 215 na molekulu při pH 7) uděluje albuminu velký celkový elektrický náboj a díky tomu je výborně rozpustný, lze vytvořit až 20% roztok albuminu. Počet kyselých AK zbytků převažuje nad bazickými, celkový náboj molekuly HSA při pH 7 je tedy -15. ¹¹ Při mírných změnách teploty a pH je konformačně stabilní, ve struktuře dochází pouze k reverzibilním změnám. ⁹ Stabilitu struktury zajišťují zejména disulfidické můstky mezi cysteinylovými zbytky. ¹¹ Isoelektrický bod HSA je přibližně 5,1. ⁹

3. 1. 5. Funkce albuminu

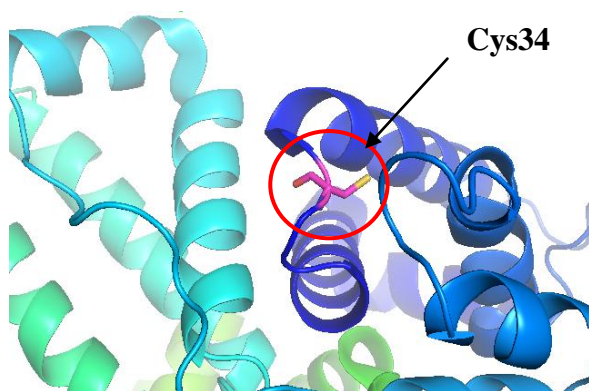
Jak bylo zmíněno výše, hlavní funkci, kterou albumin zastává, je transport. Díky albuminu se velká spousta sloučenin, zejména hormony a mastné kyseliny, efektivněji dopravuje na určené místo. Jedním z důvodů je zvýšení rozpustnosti hydrofobních látek v plazmě po jejich vazbě na albumin. Jako transportér léčiv zvyšuje dobu cirkulace léčiva v oběhovém systému a ovlivňuje tak jeho biodostupnost. ¹⁶ Přibližně ze 75 % zodpovídá za onkotický tlak v krvi. ⁶ Také je schopný odlišit jednotlivé stereoizomery, což dělá albumin nejvíce enantioselektivním proteinem v plazmě. ⁶ Snižuje aktivitu toxinů a patří k významným antioxidantům díky přítomnosti AK obsahujících síru (Cys34, methioninové zbytky) a díky chelatačním vlastnostem N-koncového peptidu. Někdy se projevují také jeho pseudoenzymatické funkce ⁶, např. esterázová aktivita HSA při deacetylaci aspirinu. ¹¹ Dále má určité protizánětlivé vlastnosti. Ty jsou potvrzené experimenty, dokazujícími vazbu HSA k některým povrchovým komponentám grampozitivních a gramnegativních bakterií, zodpovědným za aktivaci imunitního systému skrz receptor TLR4. ¹⁷ Rozsáhlé studie jeho struktury odhalily jeho význam v různých fyzikálních procesech a roli biomarkeru při různých onemocněních, např. při rakovině nebo revmatoidní artritidě. ¹⁸ Příkladem může být vazba oxidu dusnatého (NO) na Cys34 za vzniku N-nitroso-albuminu. Oxid dusnatý má totiž regulační roli při vzniku trombózy, albumin tedy vykazuje antitrombotický efekt. ⁵

3. 1. 5. 1. Cys34 - význam

Jediný volný cysteinylový zbytek ve struktuře albuminu, Cys34, je díky přítomnosti volné thiolové skupiny regulátorem oxidačně-redukční rovnováhy v plazmě. Vychytává volné radikály a má vysokou afinitu i k některým iontům, jako jsou Cd^{2+} , Pt^{2+} , Hg^{2+} , $\text{Cu}^{+/2+}$, $\text{Fe}^{2+/3+}$ a Zn^{2+} . Měďné a železnaté ionty často tvoří reakci s kyslíkem nebo s peroxidem vodíku reaktivní kyslíkové radikály mechanismem Fentonovy reakce.

Vazbou těchto iontů na HSA obvykle dojde zablokování jejich vstupu do Fentonovy reakce. ¹¹

Cys34 (obr. č. 3) se nachází v napůl otevřené štěrbině v subdoméně IA v blízkosti třech ionizovatelných skupin - imidazolového kruhu zbytku His39 a karboxylových skupin zbytků Asp38 a Tyr84. Toto uspořádání udržuje Cys34 v redukované formě (HSA-SH) při nízkém pKa a zamezuje intermolekulární tvorbě disulfidických můstků (dimerizaci). Oxidované formy Cys34, jako je kyselina sulfinová (HSA-SOOH) a kyselina sulfonová (HSA-SO₃H) se vyskytují v minoritním množství a s jejich nárůstem souvisí patologické stavy. ¹⁹



Obr. č. 3: Cys34 (růžová) ve struktuře HSA v programu PyMol (PDB kód: 1E78). ¹³

3. 1. 5. 2. Vazba iontů

Na molekule HSA najdeme spoustu míst pro vazbu iontů kovů Mg²⁺, Al³⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Co³⁺, Ni²⁺, Cu⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pt²⁺, Hg²⁺ a Tb³⁺. Tři místa však dominují díky přítomnosti vhodně uspořádaných AK zbytků pro vazbu odlišných iontů. ²⁰ Jedno se nachází na N-konci polypeptidu, kde jsou dusíkové atomy AK zbytků Ala1, Ala2 a His3, na které se vážou ionty Cu²⁺, Co²⁺ a Ni²⁺. ²¹ Druhé místo reprezentuje thiol Cys34, který váže ionty Au⁺, Hg²⁺ a Pt²⁺. ⁴ Třetí vazebné místo s vysokou afinitou pro Cd²⁺ a Zn²⁺ zahrnuje His67, Asn99, His247 a Asp249. ²²

3. 1. 5. 3. Vazba léčiv

Díky tomu, že na molekulách albuminu existují vazebná místa s vysokou afinitou k různým endogenním i exogenním látkám, se koncentrace volných toxických látek po vazbě do těchto míst snižuje.²³ V molekule HSA se vyskytují dvě primární vazebná místa pro léčiva, která jsou homologní, ale liší se afinitou k vazbě léčiv. První, tzv. Sudlowovo místo I (vazebné místo pro warfarin), je umístěno v subdoméně IIA a vážou se do něj především dikarboxylové kyseliny a heterocyklické sloučeniny o vysoké molekulové hmotnosti jako je warfarin, azopropazon a fenylbutazon.¹⁹ Druhé, označené jako Sudlowovo místo II (vazebné místo pro indol/benzodiazepin), je v subdoméně IIIA a primárně váže aromatické sloučeniny, např. ibuprofen a sloučeniny obsahující indol (Obr. č. 4).¹⁸ Ve vazebném místě I ovládají afinitu především hydrofobní interakce, v případě místa II je afinita ovlivněna i elektrostatickými interakcemi a vodíkovými vazbami.¹⁰

O vazebná místa na albuminu kompetují s léčivy některé mastné kyseliny. J. Anguizola a kol. (2013) zkoumali kombinovaný účinek glykace a několika mastných kyselin s dlouhým řetězcem na celkovou vazbu HSA k řadě derivátů sulfonylmočoviny²⁴, které působí jako antidiabetika (léčí diabetes 2. typu)²⁵. Výsledky ukázaly zvýšenou afinitu glykovaného HSA (gHSA) k měřeným léčivům a ve stejné míře sníženou afinitu HSA i gHSA k těmto léčivům v přítomnosti mastných kyselin s dlouhým řetězcem²⁴, jako je kyselina linoleová, kyselina olejová, kyselina palmitová a stearová.²⁶

3. 1. 6. Posttranslační modifikace albuminu

3. 1. 6. 1. Oxidace

Oxidované formy albuminu souvisí s výskytem patofyziologických stavů. Endogenně vytvářené reaktivní kyslíkové radikály způsobují oxidační degradace a poškození makromolekul (oxidační stres). Vytváří množství změn ve 3D struktuře proteinu, čímž ovlivňují vazby a interakce s léčivy.¹ Albumin podléhá oxidaci při nefrotickém syndromu²⁷ a je hlavním cílem oxidačního stresu při chronickém selhání ledvin a u hemodialyzovaných pacientů.²⁸

Jak bylo zmíněno výše, Cys34 obsahuje thiolovou skupinu a jeho význam spočívá ve vazbě léčiv, avšak důležitý je také právě při měření výskytu oxidovaných stavů HSA. Za běžných fyziologických podmínek se HSA vyskytuje ze 70-80 % v redukované formě s volnou thiolovou skupinou na zmíněném cysteinylovém zbytku. Takovéto formě se říká merkaptoalbumin. Z 20-30 % je Cys34 zapojen do reverzibilně tvořených disulfidických můstků s molekulami obsahujícími thiolovou skupinu, např. cystein, cysteinylglycin, homocystein a glutation. V tomto případě mluvíme o non-merkaptoalbuminu 1. V malém měřítku může být Cys34 oxidovaný na sulfonovou kyselinu (non-merkaptoalbumin 2). Poměr těchto forem pak určuje antioxidační kapacitu HSA.⁶

Při různých studiích byla objevena řada typů modifikací HSA, např. peroxynitrit (ONOO⁻) způsobuje modifikaci Tyr zbytků, kyselina chlorná HOCl modifikuje boční řetězce proteinů a způsobuje zesíťování. Velmi významnými oxidačními činidly jsou chloramin-T a N-chlorpyrrolidin-2,5-dion. Obě tyto látky oxidují Met zbytky v proteinech na methionin sulfoxidy v neutrálním a mírně alkalickém pH.¹

3. 1. 6. 2. Glykace / glykosylace

Spontánní neenzymatická reakce monosacharidu s proteiny se nazývá glykace.¹¹ K takové modifikaci může dojít reakcí volných aminoskupin albuminu s redukujícími cukry nebo s reaktivními produkty jejich degradace.⁵ Běžná spontánní glykace probíhá podle mechanismu Maillardovy reakce.²⁹ Zpočátku dochází k tvorbě Schiffovy báze reakcí redukujícího cukru s primární aminoskupinou na N-konci proteinu a několika lysinových zbytcích (Lys525, Lys439, Lys281, Lys199). Schiffova báze se může přeskupit v Amadoriho produkt.²⁴ Nakonec se glykují i zbytky argininu. Pokud dojde ke glykacím v blízkosti Sudlowových míst, mohou mít vliv na vazebnou kapacitu HSA. Mírné snížení vazebné kapacity HSA může tak mít za následek velké zvýšení volné aktivní formy léčiva v krvi.⁶ Např. glykace na Lys199 zvyšuje afinitu k warfarinu, ale zároveň snižuje afinitu k bilirubinu.¹¹

U zdravých dospělých osob se hladina gHSA pohybuje mezi 11 a 16 %, zatímco osoby s diabetem mellitus mají tuto hladinu zvýšenou na 20 až 30 %. A proto gHSA může být pomocnou komponentou při stanovování koncentrace glukózy v krvi.²

Glykosylace se od glykace liší především v tom, že je to enzymatická a často reverzibilní modifikace. Má důležitou roli při reverzibilní modulaci struktury a funkce proteinu a při regulaci buněčné homeostázy.³⁰

3. 1. 6. 3. Delece

Jak na N-konci, tak na C-konci HSA mohou chybět některé AK zbytky. Často albumin postrádá na N-konci Asp-Ala zbytky, které jsou zodpovědné za chelataci volných kovových iontů. Na C-konci HSA nejčastěji chybí leucinový zbytek, molekula má pak kratší dobu života (méně než 80 hodin).⁶

3. 1. 6. 4. Dimerizace

Mezi molekulami HSA může dojít k dimerizaci tvorbou disulfidické vazby na Cys34 v důsledku zvýšeného oxidačního stresu. Biologický účinek dimerizace není zcela jednoznačný. Určitě se ale zmenšuje počet volných Cys34 v jednotlivých molekulách HSA, a tím se snižuje antioxidační účinek. Na druhou stranu se vlivem dvojitě molekulové hmotnosti a delšího poločasu života zlepšuje transport léčiv.⁶

3. 1. 7. **Hypoalbuminémie**

Nízké množství albuminu v krvi neboli hypoalbuminémie nastává při zmenšené tvorbě v játrech, při zvýšeném katabolismu nebo renální a enterální ztrátě, a to zejména při podvýživě nebo zánětu. Může být také důsledkem jaterních onemocnění. Výskyt některých srdečních chorob (ischemické choroby srdeční, fibrilace síní, infarkt myokardu) je nepřímo závislý na hladině sérového albuminu v krvi, nemluvě o příspěvku rizikových faktorů, jako je kouření nebo zvýšení hodnoty BMI.³¹

3. 1. 8. **Analbuminémie**

Analbuminémie je velmi vzácná porucha, při které člověk HSA úplně postrádá nebo je jeho množství drasticky sníženo.⁴ Poprvé byla diagnostikována v roce 1954 31leté ženě z Německa, která byla pod dohledem lékařů kvůli zvýšené sedimentaci erytrocytů, otoku kotníku a časté únavě, mimoto však nebyla nemocná. Od té doby se objevilo okolo 50 případů analbuminémie v rodinách po celém světě.¹¹

K rozeznání prvních příznaků dochází většinou ve věku kolem 24 let, jsou to hlavně různé typy edémů a únava, jak tomu bylo v prvním případě. Sekundárním příznakem je hyperlipidémie, při které jsou hodnoty lipoproteinů a celkového cholesterolu výrazně nad horními limity.¹¹

3. 1. 9. Albuminurie

Albuminurie je patologický stav, při kterém se albumin objevuje v moči v abnormálním množství (běžně pouze ve stopovém). Nastává zejména u pacientů s onemocněním ledvin (ledviny nedokážou filtrovat velké molekuly nebo jsou poškozené zvýšeným příjmem solí), dále pak při dlouhodobém diabetu (zejména 1. typu). V moči se tak může vytvořit bílá pěna, pacient může mít otoky kotníků, rukou, břicha nebo tváří.³²

3. 2. Mastné kyseliny

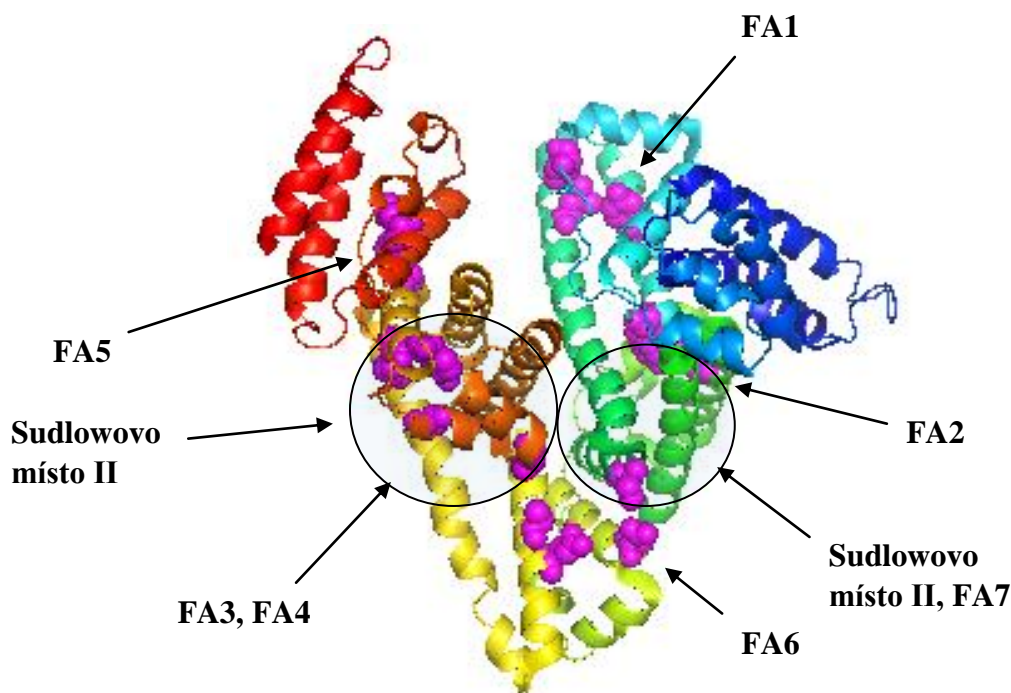
Mastné kyseliny (FAs, tj. „fatty acids“) slouží savcům jako poměrně vydatný záložní zdroj energie. Jejich úloha je ale také stavební, jelikož jsou součástí buněčných membrán a tukových buněk v adipózní tkáni, a pokud zrovna neplní funkci energetického zdroje, slouží jako izolační a ochranný materiál orgánů. Hlavním zdrojem FAs jsou lipidy, z nichž vznikají trávením v gastrointestinálním traktu pomocí pankreatických hydrolytických enzymů. Určité množství vzniká také ze sacharidů v játrech.¹²

Jen velmi malé množství FAs (<0,01 %) se vyskytuje volně v plazmě.³³ Rozpustnost mastných kyselin ve vodných roztocích je velice nízká. Z toho důvodu potřebují využívat transportéry pro přepravu z tukových buněk do buněk, které je spotřebovávají. Jedním z takových transportérů s vysokou afinitou vůči mastným kyselinám je právě sérový albumin.³⁴

3. 2. 1. Interakce sérového albuminu s mastnými kyselinami

Ve struktuře HSA se vyskytuje sedm vazebných míst s vysokou afinitou k neesterifikovaným mastným kyselinám s dlouhým řetězcem. Značí se zkratkami FA1 až FA7. Absolutně nejvyšší afinitu k mastným kyselinám mají místa FA2, FA4 a FA5, která mají tvar úzké dlouhé hydrofobní „kapsy“. Za extrémních podmínek dokáže jedna molekula albuminu nekovalentně navázat 6 až 7 molekul mastných kyselin.³³

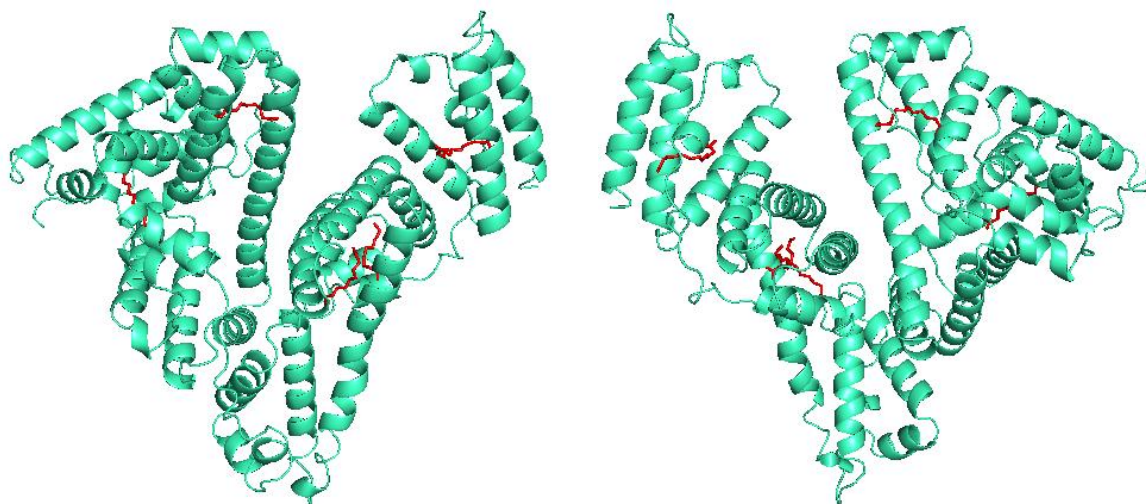
První vazebné místo se nachází v subdoméně IB, a kromě FAs váže i další ligandy (hem, bilirubin, exogenní sloučeniny). Druhé leží na rozhraní IA a IIA, třetí a čtvrté v subdoméně IIIA (Sudlowovo místo II)⁸, páté v IIIB, šesté mezi IIA a IIB, a sedmé v subdoméně IIA (obr. č. 4). Na molekule albuminu najdeme i spoustu dalších míst, kam se mohou mastné kyseliny navázat, jsou to tzv. sekundární vazebná místa pro FAs. Afinita FAs k těmto místům je však pětikrát až desetkrát menší než ve zmíněných sedmi primárních polohách.¹² V blízkosti vazebných míst pro FAs jsou také místa, na která se váží různé další molekuly, např. ionty kovů a léčiva (ibuprofen, warfarin a další).³⁵



Obr. č. 4: 3D struktura HSA s vyznačenými AK zbytky typickými pro vazbu FA (růžová) a Sudlowovými místy v programu PyMol, **FA1** - Arg117, Tyr161, Leu182, **FA2** - Tyr150, Arg257, Ser287, **FA3** - Ser342, Arg348, Arg485, **FA4** - Arg410, Tyr411, Ser489, **FA5** - Tyr401, Lys525, **FA6** - Arg209, Lys351, Ser480, **FA7** - Leu238, Ala291.⁸(PDB kód: 1E78)¹³

Vazba HSA-FA se může vytvořit také díky přítomnosti bazických řetězců aminokyselin ve struktuře HSA, které tvoří specifické solné můstky s funkčními karboxylovými skupinami řetězce mastných kyselin.¹² Solný můstek je typ vazby vzniklý kombinací dvou nekovalentních vazeb, vodíkové vazby a elektrostatické vazby. V místě FA5 karboxylová skupina mastné kyseliny tvoří vodíkový můstek s atomem kyslíku zbytku Tyr401 a solný můstek s aminoskupinou zbytku Lys525.³³

Vazebné vlastnosti albuminu vůči mastným kyselinám jsou často ovlivněné glykosylací HSA. Odlišné účinky mají však nejen různé struktury sacharidů, ale také záleží na lokaci v molekule HSA. Např. v subdoméně IA glykosylace nemá téměř žádný vliv na vazbu FAs, na rozdíl od glykosylací v subdoménách IIB nebo IIIB, které zvyšují tvorbu vazeb HSA-FA.¹¹



Obr. č. 5: Model komplexu HSA a kyseliny myristové (červená) v programu PyMol (PDB kód 1BJ5).³⁶

3. 2. 2. Nitrované mastné kyseliny

Nitrované deriváty mastných kyselin ($\text{NO}_2\text{-FA}$) jsou předmětem zájmu pro výzkum zejména od roku 2003, kdy byla poprvé v organismu identifikovaná kyselina nitroolejová.³⁷

Za generaci těchto derivátů mohou pravděpodobně reaktivní dusíkové radikály, které společně s kyslíkovými vznikají při různých zánětlivých a metabolických reakcích. Mechanismus vzniku $\text{NO}_2\text{-FA}$ z těchto radikálů však není přesně znám.³⁸

$\text{NO}_2\text{-FA}$ mají elektrofilní povahu, tzn. jedna nebo více skupin na molekule „postrádá“ elektrony a může je přijmout od jiných, na elektrony „bohatých“, molekul (nukleofilů).³⁸ Jednou z takových nukleofilních sloučenin je právě HSA a jako hlavní transportér mastných kyselin je předmětem zájmu současných studií zaměřených na $\text{NO}_2\text{-FA}$. K reakcím elektrofilů s HSA dochází primárně na volné thiolové skupině Cys34 a na aminoskupinách His, Trp, Lys a N-konce.³⁹

Řada studií přisuzuje nitrovaným FAs vlastnost spouštět pleiotropní signální dráhy včetně těch, které vedou k protizánětlivým a antioxidačním reakcím.^{40, 41} Takové vlastnosti mají díky elektrofilní kapacitě β -uhlíku reaktivního nitroalkenylového substituentu, který podléhá reverzibilní Michaelově adici. Tato reakce se nazývá nitroalkylace a dochází k ní primárně na funkčně významných Cys a His zbytečích proteinů a enzymů regulujících transkripci.⁴²

NO₂-FA se metabolizují velice podobně jako nesubstituované mastné kyseliny, tedy především podstupují ω - a β -oxidaci nebo z nich esterifikací vznikají lipidy. V mnoha případech si produkty jejich metabolismu zachovávají elektrofilní charakter. V případě tvorby komplexních lipidů pak nemohou takto zabudované NO₂-FA interagovat s proteiny a tvoří se zásoba těchto derivátů v buňkách.³⁷

Některé NO₂-FA (kyselina nitroolejová, kyselina nitrolinolová) fungují jako antagonisté receptoru PPAR γ ⁴³, signální dráhy Keap1-Nrf2⁴⁴ a tepelného šoku.⁴³ Díky antagonistickým vlastnostem NO₂-FA vůči transkripčním faktorům NF- κ B silně podporují protizánětlivou reakci.⁴⁵ Vzhledem k široké škále protizánětlivých účinků NO₂-FA jsou tyto deriváty potenciálními kandidáty na léčiva.

3. 3. Metody izolace albuminu

3. 3. 1. Cohnova metoda

Jednou z původních metod pro izolaci HSA z plazmy je metoda Edwina J. Cohna, která se skládá z několika základních kroků, založených na rozdílné rozpustnosti albuminu a ostatních proteinů v plazmě při různých hodnotách pH, koncentracích ethanolu, při různých teplotách, iontové síle a koncentraci proteinu.⁴⁶

Izolace probíhá tak, že všechny tyto zmíněné podmínky se postupně mění (koncentrace ethanolu roste od 0 % do 40 %, pH klesá od 7 k 4,8, teplota klesá z laboratorní teploty až k -5 °C) a z původně zmražené krve jsou odebírány frakce, z nichž každá obsahuje specifický precipitát. Při pH 4,8 a koncentraci ethanolu 40 % se vysráží albumin (poslední frakce). Množství plazmy v poslední frakci je ale pouze 1 %, výtěžek albuminu je tedy velmi nízký. Nevýhodou metody je také poměrně malá čistota izolátu. Za účelem zvýšení výtěžků a snížení množství nečistot se tato metoda postupně zdokonalovala, až se začala kombinovat s novějšími technikami chromatografie. V roce 1949 skupina Oncley a kol. modifikovala Cohnovu metodu a zvýšila tak čistotu izolovaného HSA.⁴⁷

3. 3. 2. Kombinace Cohnovy metody a kapalinové chromatografie

Kombinace těchto dvou metod, kterou poprvé publikovala skupina Tanaka a kol. v roce 1998, umožňuje velmi kvalitní izolaci a purifikaci plazmových proteinů a používá se k průmyslové produkci těchto proteinů.⁴⁸ Použití kapalinové chromatografie (LC) významně zvyšuje výtěžek i čistotu izolovaného albuminu.⁴⁹

3. 3. 3. Izolace z placenty

Skupina Joaquin Cabrera-Crespo a kol. (2000) popsala techniku izolace HSA z lidské placenty, která zahrnuje vysrážení ethanolem a iontově výměnnou chromatografií. Purifikace albuminu z placenty je jeden z nejefektivnějších způsobů, který šetří materiálem a izolovaný HSA má čistotu 97,1 %.⁵⁰

3. 3. 4. Afinitní srážení HSA za použití kopolymeru P_{NBN} a L-thyroxinu

Při této metodě se albumin fixuje pomocí afinitního ligandu L-thyroxinu, navázaného na kopolymer P_{NBN} (N-methylol akrylamid, butylakrylát, N-izopropyl akrylamid). L-thyroxin je syntetická forma hormonu vylučovaného folikulárními buňkami štítné žlázy. Tato poměrně jednoduchá metoda izoluje HSA s přijatelnou čistotou v jednom kroku.⁵¹

3. 3. 5. Metoda srážení za zvýšené teploty

V porovnání s ostatními proteiny v plazmě je albumin odolný vůči velkým změnám teploty. Toho lze využít u metody, při které se používá 0,04 M kyselina kaprylová na stabilizaci pH 5 při 60 °C. Při tak vysoké teplotě se deaktivují potenciální patogeny a všechny ostatní proteiny denaturují a vysráží se ze séra. Albumin, který zůstává v roztoku, se poté zakoncentruje precipitací a ultrafiltrací v čistotě 98 %.⁵²

3. 3. 6. Precipitace síranem amonným v kombinaci s LC

Další metoda purifikace HSA používá vysrážení albuminu síranem amonným a separaci kapalinovou chromatografií. Nejprve je albumin oddělen od imunoglobulinů pomocí 50% síranu amonného. Následně se odstraní lipidové složky ledovým acetonem a pro purifikaci proteinů se používá vylučovací chromatografie. K vyhodnocení se používá western blotting a chemiluminiscence.⁵³

3.3.7. Precipitace směsí TCA/aceton

Chen a kol. v roce 2005 přišli s metodou vysrážení HSA ze séra směsí kyseliny trichloroctové (TCA) a ledového acetonu. Ze série experimentů došli k nejlepším výsledkům při použití obsahu 10 % TCA/aceton, čímž získali až 60 % HSA ze vzorku. Takto vysrážený albumin si zachovává své nativní vlastnosti jako je rozpustnost, teplotní stabilita, elektroforetická mobilita, struktura a další. Hlavním cílem této metody však bylo obohatit vzorky séra o ostatní proteiny, které se v séru vyskytují v malém množství, a usnadnit tak jejich detekci.⁵⁴

3.3.8. Iontově výměnná chromatografie

Mezi technikami pro purifikaci proteinů a jejich izolaci v co největší čistotě dominují chromatografické metody. Z nich je široce používaná, nejen pro izolaci albuminu, právě iontově výměnná chromatografie (IEC).⁴⁹ Pro minimalizaci nevýhod IEC (např. časová náročnost, nízká průtoková rychlost) se vyvinula iontově výměnná chromatografie s membránovými adsorbenty (IEM), použitá Frerickem a kol. (2006). Prvním krokem této techniky je odstranění euglobulinu (skupina globulinů charakteristická špatnou rozpustností ve vodě a dobrou rozpustností v solných roztocích⁵⁵ z plazmy, a poté následuje několik purifikačních procesů a izolace albuminu. (schéma č. 1)⁵⁶ Proti technikám na bázi kolonové chromatografie má IEM vysokou separační účinnost, redukuje množství použitého pufru a nevyžaduje tolik pracovního prostoru. Na druhou stranu je to poměrně drahá technika se špatným průmyslovým využitím.⁴⁹

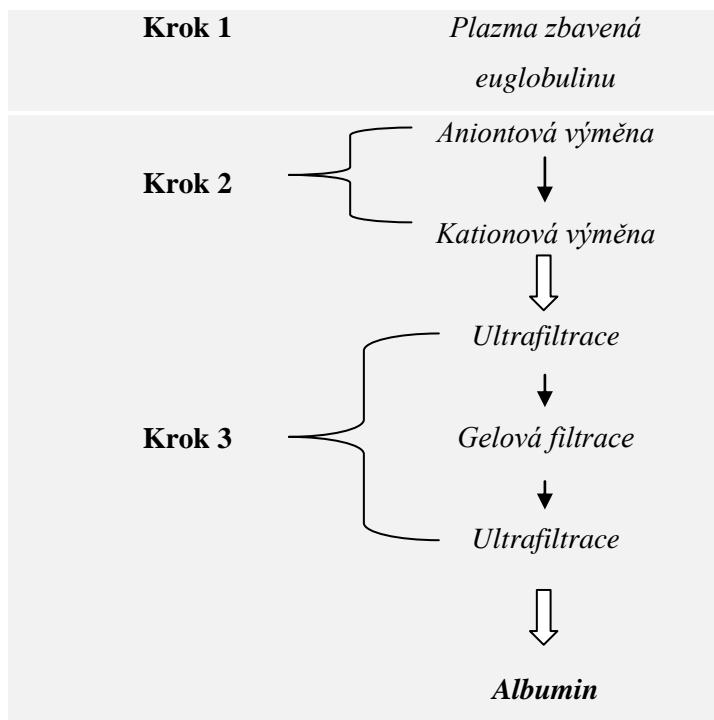


Schéma č. 1: *Jednotlivé kroky IEM (Frerick a kol., 2006)* ⁵⁶.

3. 3. 9. Vylučovací chromatografie

Vylučovací chromatografie (SEC) je metoda typu chromatografie na obrácené fázi, při které se velké proteiny zachycují na povrch hydrofilní stacionární fáze stérickým vyloučením polyethylenglykolem (PEG), který je v mobilní fázi. Eluce zachycených proteinů se provádí snížením koncentrace PEG. Wang a kol. v roce 2014 použili kolonu naplněnou kryogelovým polyakrylamidem. Výhodou kryogelu jsou jeho velké póry (10-100 μm), což umožňuje vysokou průtokovou rychlost. ⁵⁷

3. 3. 10. Afinitní chromatografie s použitím barviva jako ligandu

Afinitní chromatografie je typem kapalinové chromatografie, která používá k separaci stacionární fázi s afinitním ligandem za účelem selektivní purifikace analytu a sledování biologických interakcí. ⁴⁹ Afinitní ligandy však nemusí mít čistě přírodní charakter. Pro selektivní purifikaci albuminu a některých dalších proteinů plazmy jsou vhodná syntetická triazinová barviva. ⁵⁸

3. 3. 11. Imunoafinitní chromatografie (IAC)

Raoufinia a kol. (2016) aplikovali agarózu aktivovanou kyanobromidem na účinnou purifikaci a zvýšení čistoty HSA. Pro purifikaci potřebné protilátky použili IEC a afinitní chromatografii s proteinem G, a poté ji navázali na zmíněnou agarózu. Takto připravená stacionární fáze pak posloužila k selektivní izolaci HSA z lidského séra v čistotě 98 %.⁵⁹

3. 4. Metody detekce albuminu

3. 4. 1. Elektroforéza

Elektroforetické metody jsou poměrně dlouho a stále často používané zejména pro separaci a detekci proteinů. Varianta kombinující dělení podle velikosti (nebo molekulové hmotnosti s použitím dodecylsírany sodného) a podle isoelektrického bodu se nazývá dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE).⁶⁰ Je však pracná, vyžaduje relativně velké množství vzorků a má omezený rozsah molekulových hmotností pro detekci.⁶¹ L. Anderson (1977) použil tuto metodu pro analýzu velkého počtu vzorků lidské plazmy a detekci obsažených proteinů včetně HSA.⁶²

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) separuje látky na základě jejich odlišné rychlosti migrace v elektrickém poli v prostoru dlouhé úzké kapiláry. Mezi její výhody patří nízká spotřeba vzorku a mobilní fáze, rychlá analýza a snadná automatizace. Umožňuje také volbu různých detekčních metod a separačních módů.⁶³

Stanovení HSA v odpovídajícím pásu po elektroforéze se provádí denzitometricky, často s použitím fotodiod pro vysoké rozlišení.⁶⁴

3. 4. 2. Elektrochemické metody

Typickými elektrochemickými analytickými metodami jsou polarografie a voltametrie. Fungují na principu měření závislosti elektrického proudu na napětí vloženém na elektrody ponořené do roztoku, v němž probíhá elektrolyza. Potenciál pracovní elektrody se při měření mění s časem podle určité funkce (např. lineární změna potenciálu při cyklické voltametii). Podmínkou pro použití těchto metod je elektroaktivita analytu, tj. musí být schopen elektrochemické přeměny (v případě albuminu dochází k redukci, pracovní elektroda má charakter katody). Nejčastěji se používají rtuťové elektrody.⁶⁵

Ostatná a kol. (2006) zkoumali pomocí elektrochemických metod nativní a denaturovaný stav hovězího sérového albuminu (BSA). Použili DC polarografii (polarografie za stejnosměrného proudu), adsorpční rozpouštěcí voltametrii (AdSV) a chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu (CPSA).⁶⁶

Detailní popis aplikace elektrochemických metod ve výzkumu proteinů lze nalézt v přehledné práci výzkumné skupiny Emila Palečka a kol. (2015).⁶⁷

3. 4. 3. Spektrofotometrické metody

Skupina Doumas a kol. v roce 1971 publikovala rychlou a spolehlivou metodu měření HSA za použití barviva bromkrezolové zeleně. Byla měřena absorbance při 628 nm v 0,075 M sukcinátovém pufru (pH 4,2) a závislost absorbance a koncentrace byla lineární u vzorků obsahujících HSA do 6 g/dl. Použití neiontové povrchově aktivní látky Brij-35 snížilo absorbanci blanku a zabránilo tvorbě zákalu. Výsledky těchto měření jsou téměř shodné s výsledky elektroforetickými.⁶⁸ Strukturálně podobným barvivem je bromkrezolový purpur, představený v roce 1968. Komplex bromkrezolového purpuru s HSA má charakteristické zbarvení a jeho absorbance se měří při 590 nm.⁶⁴

Další techniky detekce používají fluorescenční sondy (fluorescenční spektroskopie). Vhodnými fluorofory pro detekci a kvantifikaci HSA jsou nízkomolekulární látky, které spontánně interagují s HSA a emitují intenzivní záření, zejména v blízké infračervené oblasti (NIR), protože tak jsou minimálně ovlivněny fluorescencí jiných biomolekul. Choudhury R. a kol. (2019) připravili dva donor-akceptorní fluorofory pro selektivní detekci a kvantifikaci HSA. Připravené fluorofory emitují záření v NIR oblasti spektra. Toto záření samotných látek je v polárních rozpouštědlech zhaseno, po komplexaci s HSA se však obnovuje. Jeden z fluoroforů dokonce selektivně interagoval s HSA s rychlým zvýšením intenzity fluorescence.⁶⁹

Vibrační spektroskopie má široké uplatnění pro zkoumání struktury a dynamiky proteinů ve vodných roztocích, protože vibrační frekvence jsou velice citlivé na různé změny (geometrické uspořádání, inter- a intramolekulární interakce). Infračervená spektroskopie (IR) je vhodná pro analýzu sekundární struktury proteinů, Ramanova spektroskopie k tomu dokáže popsat okolí AK zbytků a struktury prostetických skupin proteinů.⁷⁰

SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) je citlivá a univerzální technika, která zlepšuje Ramanův signál vzniklý interakcí molekul proteinu s nanokovovými materiály, typicky inertními drahými kovy. Tyto kovy absorbují elektromagnetické záření, jehož intenzita a vlnová délka jsou spojeny s tvarem a strukturou kovu. Scaglione F. a kol. (2019) vyvinuli nanoporézní zlato jako nový ultracitlivý biosenzor, funkcionalizovaný specifickou protilátkou pro selektivní detekci HSA.⁷¹

Wu a kol. (2000) zkoumali, jak se dají pomocí NIR korelační spektroskopie studovat strukturní změny proteinu v čase, na vzorcích HSA. Přišli na využití NIR pro identifikaci změn v sekundární struktuře, hydratace a vodíkových vazeb v proteinech.⁷⁰

3. 4. 4. Imunochemické metody

Mechanismem pro imunochemickou detekci albuminu je vytvoření komplexu HSA s antiHSA protilátkou. Díky dostupnosti antiHSA protilátek je možné specificky detekovat HSA v biologických vzorcích různými technikami, např. spojením antiHSA protilátky se standardními enzymy pro techniku ELISA. Radiální imunodifúze používá agarový gel se zachycenou antiHSA protilátkou, na kterém difunduje vzorek HSA. Průměr vzniklých skvrn (komplex HSA-antiHSA) koreluje s koncentrací albuminu. Dalšími imunochemickými metodami jsou radioimunoanalýza, imunoturbidimetrie, imunonefelometrie, a další. Imunochemické metody mohou měřit koncentraci albuminu nejen v séru, ale i v dalších tělních tekutinách (v moči - albuminurie).⁶⁴

3. 4. 5. LC/MS

Technika LC/MS kombinuje HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) hmotnostním spektrometrem pro selektivní detekci a identifikaci molekul.⁷² Liu a kol. (2014) použili tuto techniku pro měření při různých kombinacích několika organických rozpouštědel (aceton, etanol, metanol a další) v různých koncentracích za účelem selektivního odstranění HSA ze vzorků séra.⁷³ Pro detekci a kvantifikaci HSA v moči použil tuto techniku Beasley-Green a kol. (2014). Konkrétně šlo o izotopovou diluční hmotnostní spektrometrii (ID-MS) za použití LC napojené na trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr.⁷⁴

4. Experimentální část

4.1. Materiál a chemikálie

4.1.1. Chemikálie

Většina chemikálií byla pořízena od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) a BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Ekvimolární směs izomerů NO₂-OA (9-NO₂-OA a 10-NO₂-OA) v podobě methanolových zásobních roztoků nám poskytla laboratoř Bruce Freemana (University of Pittsburgh, USA) v čistotě > 98. Lidský sérový albumin zbavený mastných kyselin („fatty acid free“ HSA) byl koupen od firmy Sigma Aldrich (č. A3782) v čistotě 99 %. Všechny roztoky byly připraveny s použitím Milli-Q vody (18,2 MΩ * cm⁻¹), Millipore, Bedford, MA, USA. Jako markery molekulové hmotnosti byly použity Protein Ladder pro SDS-PAGE a SERVA Protein Marker pro nativní PAGE.

Heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄ · 7H₂O), monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH₂PO₄ · H₂O), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), koncentrovaná kyselina chlorovodíková (konc. HCl), dodecylsírán sodný (SDS), peroxosírán amonný (APS), roztok N,N'-methylenbisakrylamidu (akrylamid a bisakrylamid v poměru 29:1), N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED), glycin, glycerol, dithiotreitol (DTT), bromfenolová modř, barvivo Coomassie brilliant blue G-250, methanol (CH₃OH), kyselina octová (CH₃COOH), deionizovaná voda (dd H₂O).

4.1.2. Roztoky

Pufry pro elektrochemickou analýzu

Fosfátové pufry: 0,1 M Na₂HPO₄ · 7H₂O + 0,1 M NaH₂PO₄ · H₂O

Roztoky pro gelovou elektroforézu

10% SDS - 10 g SDS doplněných dd H₂O do 100 ml

10% APS - 0,2 g APS + 2 ml dd H₂O

40% roztok N,N'-methylenbisakrylamidu, akrylamid a bisakrylamid v poměru 29:1 (AA+Bis)

TEMED - N,N,N',N'-tetramethyletylendiamin

pufř na zaostřovací gel (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8): 3,0 g Tris, 40 ml dd H₂O, konc. HCl na úpravu pH, doplnění dd H₂O do 50 ml

pufr na separační gel (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8): 36,3 g Tris, 150 ml dd H₂O, konc. HCl na úpravu pH (4-5 ml), doplnění dd H₂O do 200 ml

1,25 M Tris-Cl pH 6,8 – 7,5 g Tris, 40 ml dd H₂O, konc. HCl na úpravu pH, doplnění dd H₂O do 50 ml

zaostřovací gel: 1,25 M Tris-Cl pH 6,8 (750 µl), AA+Bis (1,275 ml), 10% SDS (75 µl), 10% APS (7,5 µl), TEMED (7,5 µl), dd H₂O (5,250 ml) - uvedená množství odpovídají přípravě roztoku na dva gely

separační gel: 1,5 M Tris-Cl pH 8,8 (3,75 ml), AA+Bis (5 ml), 10% SDS (150 µl), TEMED (15 µl), 10% APS (75 µl), dd H₂O (6,10 ml) - uvedená množství odpovídají přípravě roztoku na dva gely

elektrodotový pufr (0,025 M Tris, 0,92 M glycín, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3) - 15,14 g Tris, 72,07 g glycín, 5 g SDS, doplnění dd H₂O do 5 l

vzorkový pufr 1 (0,125 M Tris-Cl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,2 M DTT, 0,02% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8) - 2,5 ml 1,25 M Tris-Cl pH 6,8, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerolu, 2 mg bromfenolové modři, 0,31 g DTT, doplnění dd H₂O do 10 ml

vzorkový pufr 2 (0,125 M Tris-Cl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,02% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8) - 2,5 ml Tris-Cl, 1 g SDS, 5 ml glycerolu, 5 mg bromfenolové modři, doplnění dd H₂O do 10 ml

barvicí roztok - (0,1% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250, 40% (v/v) CH₃OH, 10% (v/v) ledová CH₃COOH a 50% (v/v) H₂O

směs na odbarvení - 40% (v/v) CH₃OH, 10% (v/v) ledová CH₃COOH, 50% (v/v) dd H₂O

V případě nativní elektroforézy byl při přípravě zaostřovacího a separačního gelu vynechán detergent SDS.

4. 1. 3. Přístrojové vybavení

system pro elektrochemickou analýzu: µAutolab III analyzátor (EcoChemie, Utrecht, Netherlands) v tříelektrodotovém uspořádání

system pro elektroforézu: Mini-Protean® 3 Cell se zdrojem PowerPac 200 nebo PowerPac 3000 (BioRad Laboratories, Německo)

elektrody: referenční elektroda - Ag|AgCl|3M KCl, pomocná elektroda - platinový drátek, pracovní elektrody - visící rtuťová kapková elektroda (HMDE, povrch 0,4 mm²), pyrolytická grafitová elektroda (PGE)

pH metr: HI 2211 pH/ORP (HANNA instruments, IT)

analytické váhy: AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)

centrifuga: Eppendorf minispin (Eppendorf, Německo)

magnetická míchačka: IKA RH basic KT/C (Slabo, Česká republika)

termomixér: Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

4. 2. Metody

4. 2. 1. Vizualizace struktury HSA

Pro zobrazení 3D struktury HSA v programu PyMol (Molecular Graphics Systém, v1.7.4.5 Schrodinger, LLC) byla použita krystalová struktura z databáze Protein Data Bank (PDB kód 1GNI)⁷⁵.

4. 2. 2. Elektrochemie

Elektrochemická měření proběhla v tříelektrodevém uspořádání na analyzátoru μ Autolab III při laboratorní teplotě. Jako pracovní elektrodu pro chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu s konstantním proudem (CPSA) jsem používala rtuťovou elektrodu HMDE, a pro cyklickou voltametrii jsem použila grafitovou elektrodu PGE. Individuální nastavení pro elektrochemické experimenty a koncentrace látek jsou uvedeny v legendách příslušných grafů. Všechna měření byla provedena v přítomnosti kyslíku.

Interakce mastných kyselin NO₂-OA (OA) s HSA ($c = 6.25 \mu\text{M}$) byly studovány v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4) při 37 °C. Koncentrace mastných kyselin se měnila v závislosti na molárním poměru mastné kyseliny ku HSA, tj. 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1, 32:1 a 64:1. Vzorky byly inkubovány v daných molárních poměrech po dobu 30 min a 24 hodin. Po inkubaci byl potřebný objem směsi přenesen do elektrochemické cely, kde proběhla CPS analýza 500 nM HSA v 0,1M fosfátovém pufru (pH 6,5).

4. 2. 3. Gelová elektroforéza

Pro charakterizaci albuminu byla provedena „denaturační“ elektroforéza na SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a „nativní“ PAGE, a to na 10% Mini-Protean® TGX™ gelech (BioRad) podle Laemmliho metody ⁷⁶.

Vzorky pro denaturační elektroforézu HSA byly smíchány v poměru 1:4 se vzorkovacím pufrem 1, zahřívány po dobu 5 min na 95 °C, zchlazeny na ledu a následně zcentrifugovány. Na gel byly vzorky nanášeny v množství 5 µg HSA na jamku a podrobeny elektroforetické separaci v elektrodo­vém pufru. Gely byly následně barveny 15 min v barvicím roztoku. Odbarvení gelů bylo provedeno směsí na odbarvení po dobu, dokud nebyly gely čiré.

Pro nativní PAGE jsme použili postup dle Ornsteina ⁷⁷ a Davise ⁷⁸. Vzorky proteinu byly naředěny v poměru 1:4 se vzorkovacím pufrem 2 a podrobeny elektroforéze (5 µg proteinu na jamku) s použitím elektrodo­vého pufru bez přítomnosti SDS. Gely byly vizualizovány pomocí barviva Coomassie brilliant blue stejně jako při SDS-PAGE.

5. Výsledky

První výsledky jsem získala na základě voltametrických experimentů na pyrolytické grafitové elektrodě (cyklická voltametrie). Sledovala jsem tak oxidačně-redukční vlastnosti kyseliny nitroolejové. Použila jsem ekvimolární směs obou regioizomerů (9- a 10- nitroolejová kyselina). Kyseliny olejová (sloužící jako negativní kontrola) a nitroolejová byly předem rozpuštěné v methanolu a následně naředěné základním elektrolytem (0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4). Methanol při elektrochemických analýzách nijak neinterferoval. Elektrofilní charakter kyseliny nitroolejové se projevil redukčním procesem (pík NO) při potenciálu kolem -0,75 V (graf č. 1). Tento proces je irreverzibilní a analogický s redukcí pozorovanou u dalších nitroalkenů.⁷⁹ V závislosti na podmínkách experimentů mohou být R-NO₂ deriváty redukovány na hydroxylaminy nebo aminy.⁸⁰ V grafu č. 1 vidíme, že za podmínek experimentu kyselina olejová nepodléhá žádnému redukčnímu ději (zelená křivka).

Dále byla provedena CPS analýza kyseliny nitroolejové na rtuťové elektrodě HMDE. Opět byla použita ekvimolární směs obou regioizomerů. Zde jsem také naměřila píky NO při potenciálu kolem -0,75 V, zároveň se však objevila odezva při -1,3 V (adsorpční píky, graf č. 2). Tento píky nesouvisí s redukcí R-NO₂, ale s re-orientací nitroolejové kyseliny v adsorbovaném stavu, což bylo ověřeno voltametrií se střídavou složkou napětí.⁸¹ S rostoucí koncentrací kyseliny roste výška obou píků (graf č. 3).

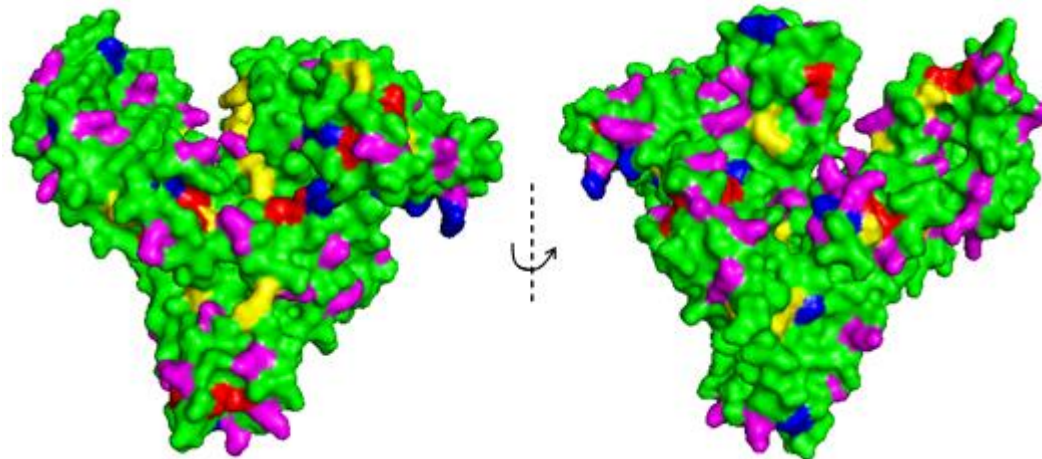
Následně jsem pomocí CPS analýzy zkoumala interakci albuminu („fatty acid free“ HSA) s kyselinou nitroolejovou (graf č. 4). Důvodem pro výběr této metody je, že můžeme s výhodou v jednom skenu sledovat píky NO (redukční proces NO₂-OA), a zároveň píky H. Ten zodpovídá za elektrokatalytický proces, do kterého se zapojují aminokyselinové zbytky albuminu (Cys, His, Lys, Arg). Lokalizace těchto AK zbytků na povrchu HSA je ukázána na schématu 2A. Pokud se na tyto zbytky naváže ligand (kyselina nitroolejová), nemohou se zapojit do elektrokatalytického procesu na rtuťové elektrodě a výška píky H se zmenší. Toho lze využít při zkoumání mezimolekulových interakcí HSA.^{82, 83} Vazebná místa pro OA ve struktuře HSA jsou znázorněna na schématu 2B. Naproti tomu píky NO se při nízkých koncentracích NO₂-OA neobjevuje, protože kyselina interaguje s molekulami albuminu, nedochází tedy k její interakci s Hg-katodou, tím pádem se nemůže redukovat. Jakmile dojde k saturaci proteinu (interakce proběhla ve všech vazebných místech pro FAs), kyselina se vyskytne volně v roztoku a může dojít k redukcí její volné formy - lze pozorovat píky NO.

Při měřeních jsem vypořádávala, že volná kyselina nitroolejová se začíná vyskytovat v roztoku při poměru molárních koncentrací 7:1 ($\text{NO}_2\text{-OA:HSA}$) a vyšším (graf č. 5).

Zmenšování píku H bylo zaznamenáno při interakci HSA s oběma mastnými kyselinami, olejovou i nitroolejovou. Křivka závislosti výšky píku H na poměru kyseliny ku HSA je u těchto dvou mastných kyselin velmi podobná. Lze tedy předpokládat, že vazebná kapacita HSA je stejná pro oba ligandy.

Nakonec jsem provedla separaci vzorků HSA inkubovaného s $\text{NO}_2\text{-OA}$ a OA pomocí SDS-PAGE a nativní elektroforézy, abych odhalila případnou tvorbu agregátů nebo fragmentů. Na základě SDS-PAGE analýzy můžeme potvrdit, že nedochází k žádné fragmentaci albuminu po inkubaci s $\text{NO}_2\text{-OA}$ nebo s OA (obr. č. 6). Při nativní PAGE nebyly pozorovány žádné agregáty způsobené interakcí HSA s $\text{NO}_2\text{-OA}$ nebo s OA (obr. č. 7). Při vyšší koncentraci ligandu ve vzorku však došlo pravděpodobně ke změně celkového náboje HSA v případě inkubace s $\text{NO}_2\text{-OA}$ v porovnání s OA. S rostoucím poměrem $\text{NO}_2\text{-OA:HSA}$ tedy roste elektroforetická mobilita HSA (obr. č. 8), což bude předmětem dalšího zkoumání.

A



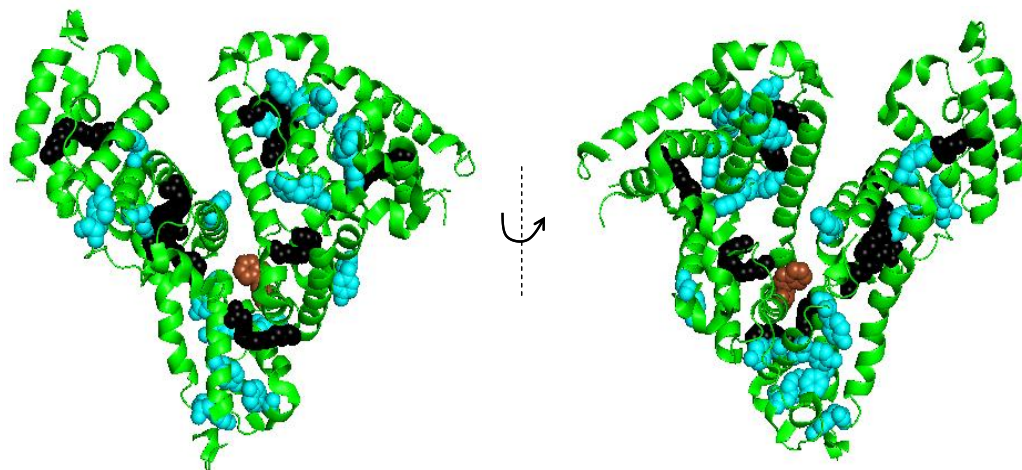
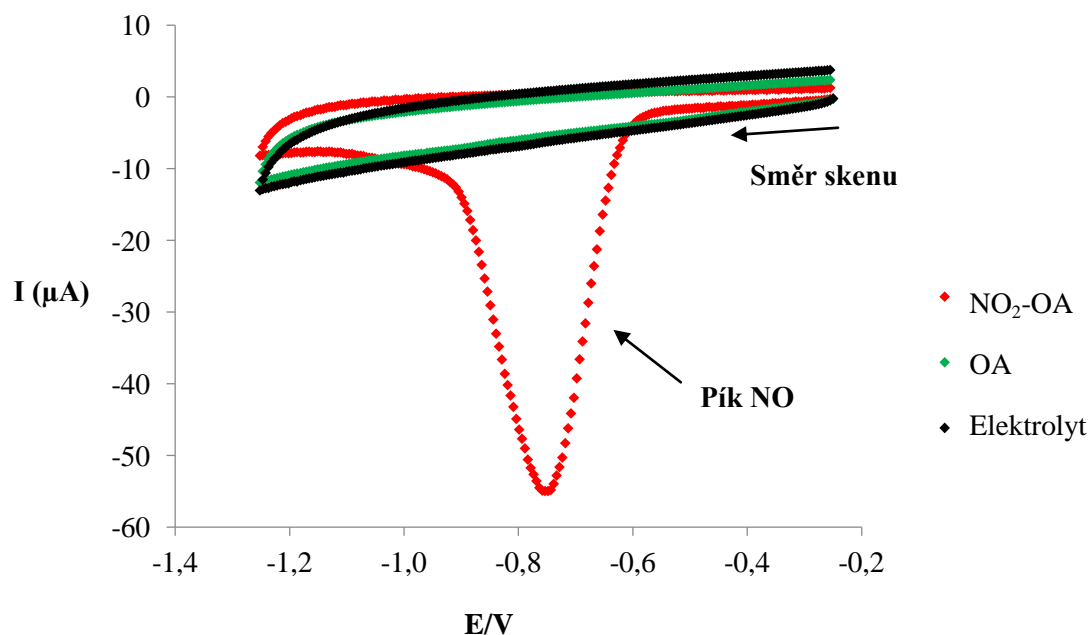
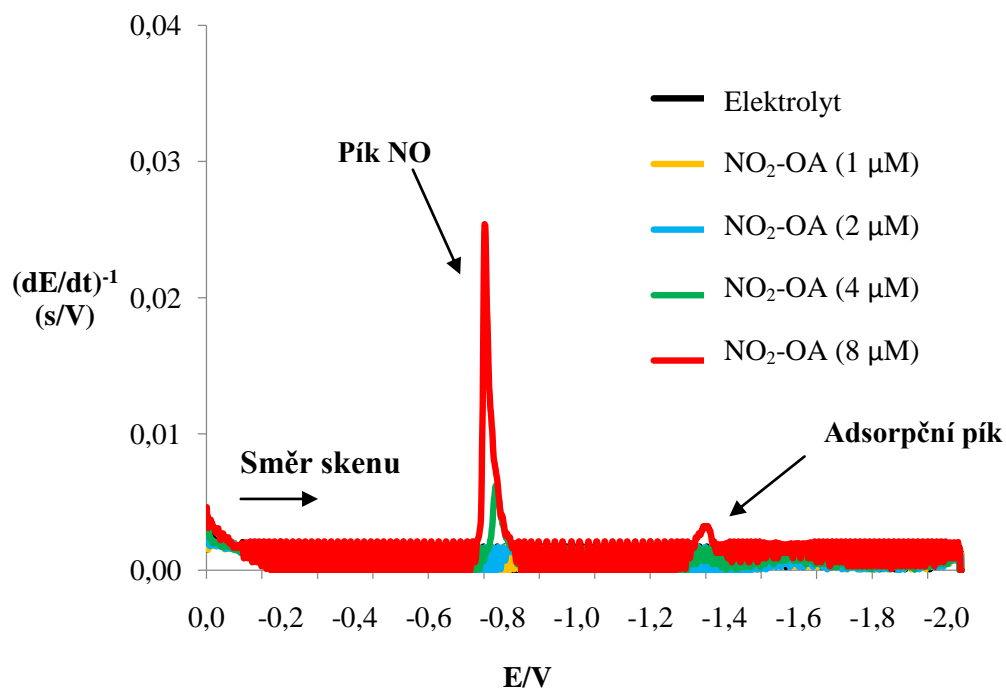
B

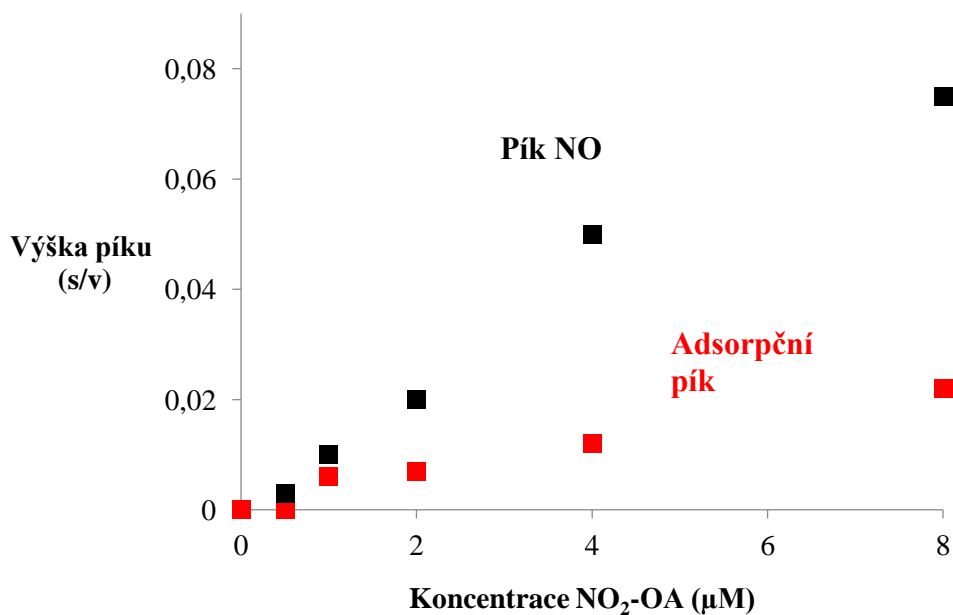
Schéma č. 2: *A: Model povrchu lidského sérového albuminu (HSA) s vyznačenými elektroaktivními aminokyselinovými zbytky (PDB 1GNI)⁷⁵, Cys – červený, His – modrý, Arg – žlutý, Lys – růžový, B: Model struktury HSA s vyznačenými vazebnými místy pro kyselinu olejovou (OA), OA – černá. Levé a pravé obrázky jsou vzájemně otočené o 180 ° podél svislé osy pro každý panel.*



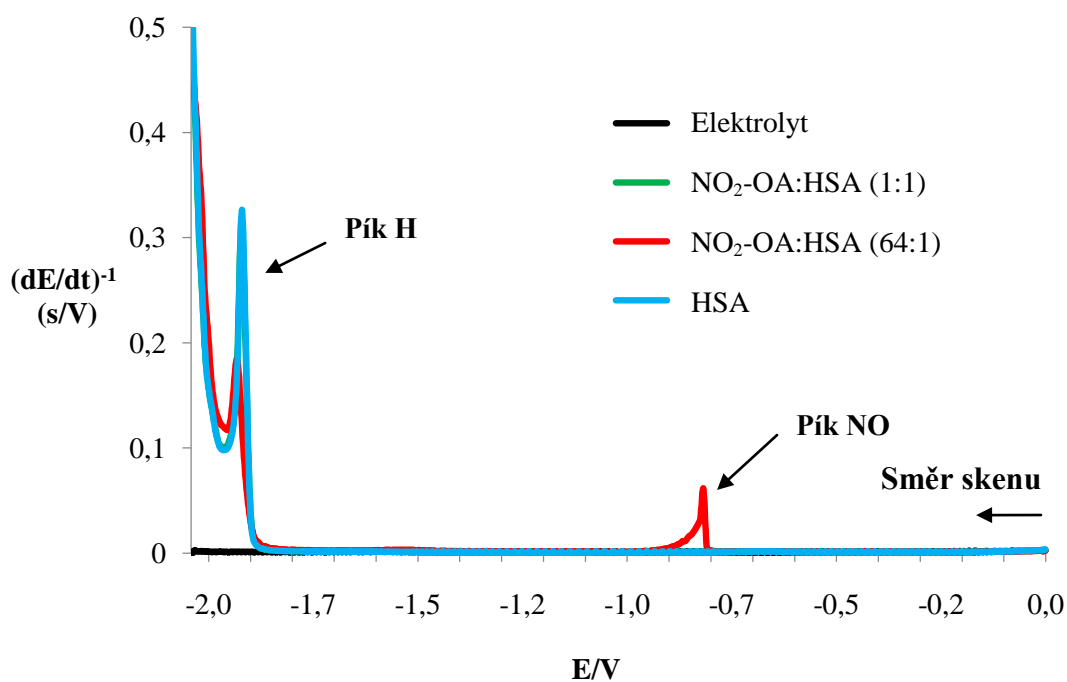
Graf č. 1: *Elektrochemická analýza NO₂-OA na pyrolytické grafitové elektrodě: cyklická voltametrie 20 μM NO₂-OA a olejové kyseliny (OA) v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4). Podmínky cyklické voltametrie: počáteční potenciál: -0,25 V, potenciál obratu: -1,25 V, konečný potenciál: -0,25 V, potenciálový krok: 5 mV, rychlost skenu: 1 V/s.*



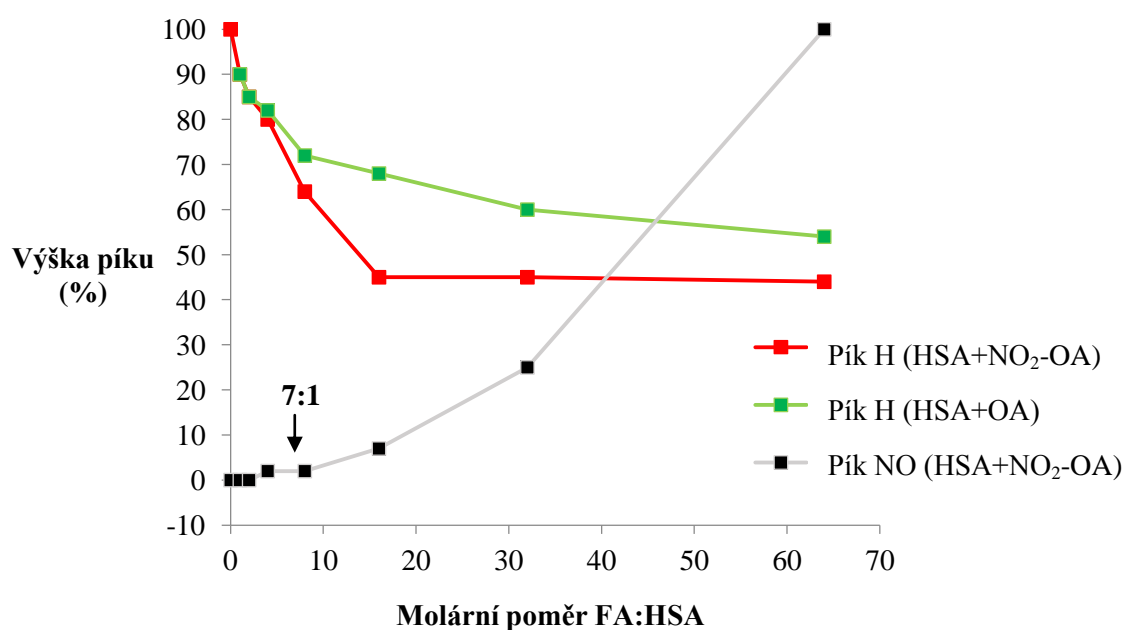
Graf č. 2: CPS analýza $\text{NO}_2\text{-OA}$ na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4), CPSA podmínky: $I_{\text{str}} = -35 \mu\text{A}$, koncentrace $\text{NO}_2\text{-OA}$ jsou uvedeny v legendě grafu.



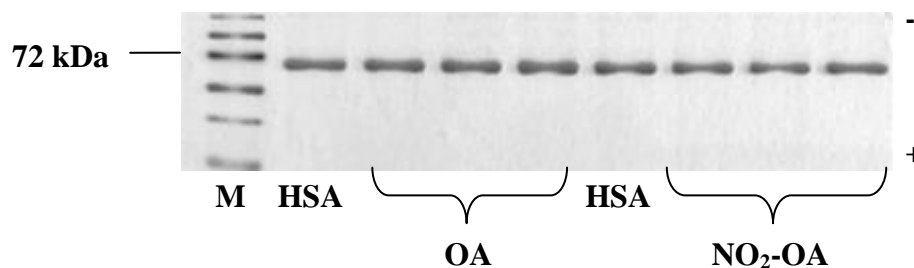
Graf č. 3: Závislost výšky pík NO a adsorpčního pík na koncentraci $\text{NO}_2\text{-OA}$. Pro další detaily viz graf č. 2.



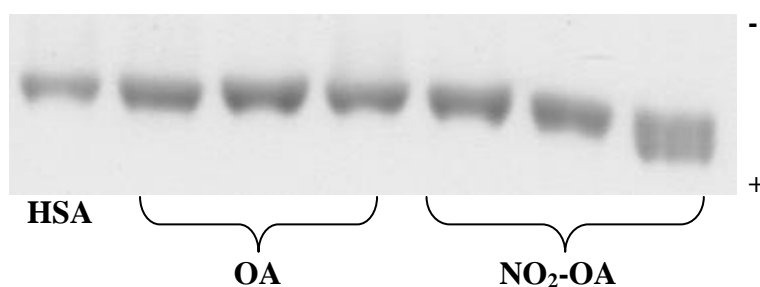
Graf č. 4: CPS analýza $\text{NO}_2\text{-OA}$ v přítomnosti HSA. HSA byl inkubován s $\text{NO}_2\text{-OA}$ v prostředí fosfátového pufru o pH 7,4 po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Koncentrace HSA v inkubační směsi byla 6,25 $\mu\text{mol/l}$. Po ukončení inkubace byly příslušné směsi naředěny fosfátovým pufrům o pH 6,5 do konečné koncentrace HSA, která činila 500 nmol/l. V legendě grafu jsou uvedeny poměry HSA: $\text{NO}_2\text{-OA}$. CPSA podmínky: $I_{\text{str}} = -95 \mu\text{A}$.



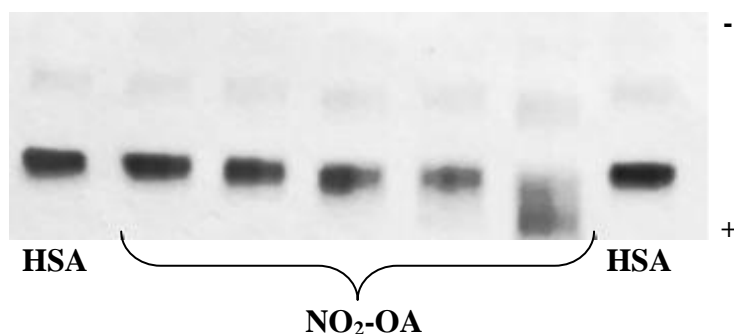
Graf č. 5: Závislost výšky píku H a NO na koncentraci NO₂-OA (OA) po inkubaci s HSA. V grafu jsou vyneseny poměry molárních koncentrací 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 a 1:64 (HSA:NO₂-OA nebo HSA:OA). CPSA podmínky jsou stejné jako u grafu č. 4. Pro další detaily viz graf č. 4.



Obr. č. 6: Denaturační SDS-PAGE elektroforeogram HSA a HSA v přítomnosti mastných kyselin po 24 hodinové inkubaci. Vzorky jsou v následujícím pořadí, zleva: marker, nativní HSA, NO₂-OA:HSA v molárních poměrech 4:1, 16:1 a 64:1, nativní HSA, OA:HSA v molárních poměrech 4:1, 16:1 a 64:1.



Obr. č. 7: Nativní PAGE elektroforeogram HSA a HSA v přítomnosti mastných kyselin po 30 minutové inkubaci, vzorky jsou v následujícím pořadí, zleva: nativní HSA, OA:HSA v molárních poměrech 4:1, 16:1 a 64:1, nativní HSA, NO₂-OA:HSA v molárních poměrech 4:1, 16:1 a 64:1.



Obr. č. 8: Nativní elektroforéza HSA po 24 hodinové inkubaci s NO₂-OA, vzorky jsou v pořadí zleva: nativní HSA, NO₂-OA:HSA v molárních poměrech 4:1, 8:1, 16:1, 32:1, 64:1 a nativní HSA.

6. Diskuse a závěr

Lidský sérový albumin je významný transportní protein obsažený v krevní plazmě. Provádí transport mnoha různorodých látek exo- a endogenního původu, ovlivňuje tak jejich biodostupnost a efektivní dopravu na určené místo.¹ Důležitou skupinou látek, která je tímto proteinem přenášena, jsou mastné kyseliny. Ty mají v organismu úlohu stavební (složky biomembrán, tukových buněk) a jsou zásobním zdrojem energie ve formě lipidů.¹² Vybrané deriváty mastných kyselin, konkrétně nitrované mastné kyseliny (kyselina nitroolejová, kyselina nitrolinolová), hrají důležitou roli při některých signálních drahách a mohou tak pozitivně či negativně ovlivnit zánětlivé procesy. Díky tomu jsou tyto deriváty v posledních letech předmětem výzkumu, který cílí především na jejich genezi, biotransformaci a transport. Tato bakalářská práce je zaměřena na kyselinu nitroolejovou, která je z posledních publikovaných studií považována za potenciální léčivo, zejména pro svoji úlohu v protizánětlivých procesech.⁴⁵

Cílem práce bylo popsat oxidačně-redukční přeměny kyseliny nitroolejové a její interakce s lidským sérovým albuminem. Experimentálně byla stanovena vazebná kapacita lidského sérového albuminu pro kyselinu nitroolejovou a elektroforeticky byla studována interakce těchto dvou biomolekul za účelem odhalení tvorby agregátů nebo fragmentů. Z již dříve publikovaných studií je nám známý charakter interakce sérového albuminu s kyselinou olejovou.⁷⁵ Kyselina nitroolejová je její substituční derivát, mohli jsme tedy předpokládat podobnost výsledků. Kyselina olejová nám proto posloužila jako negativní kontrola při měření.

Vazebná kapacita sérového albuminu pro kyselinu olejovou je 7:1 (molární poměr OA:HSA). Kyselina olejová se váže na molekulu albuminu v sedmi specifických místech.^{75, 84} Z elektrochemických měření, kde jsem sledovala zmenšování píku H s rostoucí koncentrací kyseliny nitroolejové v roztoku, a tvorbu píku NO díky přítomnosti volné kyseliny nitroolejové v roztoku, jsem vypožorovala, že vazebný poměr NO₂-OA:HSA je téměř stejný, tedy 7:1.

Gelová elektroforéza separuje látky na základě jejich molekulové hmotnosti a velikosti náboje v přítomnosti elektrického pole. Používala jsem dva druhy experimentů, elektroforézu na polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek a elektroforézu na tomtéž gelu v přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného. Tento detergent dává vzorku celkový záporný náboj, separace je tak více zaměřena na rozdíly v molekulové hmotnosti.⁷⁶ Potvrdila jsem tak integritu lidského sérového albuminu, který jsme používali pro ostatní měření. Dále jsem analyzovala albumin po inkubaci s kyselinou olejovou nebo nitroolejovou v různých koncentračních poměrech. V žádném vzorku nedošlo v tvorbě fragmentů a agregátů, které by se projevíly rozdílnou mobilitou proteinu a vytvořením nových pásů při elektroforetickém měření. Změna v elektroforetické mobilitě nastala pouze při nativní elektroforéze u vzorků HSA s vysokou koncentrací kyseliny nitroolejové (viz obr. č. 7 a 8). Při neutrálním pH má albumin záporný náboj (-15)¹¹, který mu udělují ionizované AK zbytky v jeho struktuře. Isoelektrický bod HSA je přibližně 5,1.⁹ Tyto dva faktory vysvětlují jeho pohyb k anodě v prostředí o neutrálním a zásaditém pH (hodnoty pH použitých gelů jsou 6,8 a 8,8). Kyselina nitroolejová mohla pohyb k anodě podpořit zejména vlivem jejího náboje, jelikož karboxylová skupina kyseliny je při zásaditém pH disociována ($R-COO^-$). Druhým důvodem pro změnu mobility by mohla být změna molekulové hmotnosti nebo struktury HSA po inkubaci s NO_2-OA .

Celkově můžeme konstatovat, že lidský sérový albumin transportuje kyselinu nitroolejovou. Výsledky této bakalářské práce mohou být základem pro další výzkum v oblasti nitrovaných derivátů mastných kyselin a v oblasti transportních vlastností lidského sérového albuminu.

Budoucí práce by mohly cílit na další studium komplexu albuminu s kyselinou nitroolejovou, např. stanovení isoelektrického bodu komplexu BSA-NO₂-OA metodou 2D elektroforézy. Na základě všech těchto výsledků budeme moci charakterizovat mechanismy kovalentních i nekovalentních interakcí NO₂-OA s proteiny. Kovalentní interakce s proteiny a nízkomolekulárními thioley jsou základem pro signalizaci NO₂-OA.⁸⁵ Nitroalkeny totiž usnadňují posttranslační modifikaci klíčových proteinů, jako je alkylace Cys zbytků transkripčních faktorů nebo regulačních proteinů (Keap1 regulátor Nrf2 signalizace nebo PPAR γ) *in vivo*.^{44, 86} Výsledky této práce především řeší problematiku transportu NO₂-OA proteiny plazmy prostřednictvím nekovalentních interakcí, jelikož velká zásoba sérového albuminu dokáže vázat a stabilizovat značná množství těchto a dalších elektrofilních mastných kyselin.³³ Je tedy potřeba pokračovat v práci pro plné porozumění transportu nitrovaných mastných kyselin, které jsou buď orálně přijímány, nebo tvořeny během trávení. Výzkum bude pokračovat za účelem kompletního popisu reaktivity nitroalkenů, který bude zahrnovat interakce s dalšími proteiny a biopolymery a interakce s biomembránami.

7. Seznam citací

- (1) Szkudlarek, A.; Chudzik, M. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Alteration of Human Serum Albumin Binding Properties Induced by Modifications: A Review. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *188*, 675–683.
- (2) Attar, A. M.; Richardson, M. B.; Speciale, G.; Majumdar, S.; Dyer, R. P.; Sanders, E. C.; Penner, R. M.; Weiss, G. A. Electrochemical Quantification of Glycated and Non-Glycated Human Serum Albumin in Synthetic Urine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 4757–4765.
- (3) El-Aal, M. A. A.; Al-Ghobashy, M. A.; Fathalla, F. A. A.; El-Saharty, Y. S. Preparation and Characterization of PH-Responsive Polyacrylamide Molecularly Imprinted Polymer: Application to Isolation of Recombinant and Wild Type Human Serum Albumin from Biological Sources. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1046*, 34–47.
- (4) Peters Jr, T. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, 1st ed.; Academic Press, 1995.
- (5) Rabbani, G.; Ahn, S. N. Structure, Enzymatic Activities, Glycation and Therapeutic Potential of Human Serum Albumin: A Natural Cargo. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 979–990.
- (6) Naldi, M.; Baldassarre, M.; Domenicali, M.; Bartolini, M.; Caraceni, P. Structural and Functional Integrity of Human Serum Albumin: Analytical Approaches and Clinical Relevance in Patients with Liver Cirrhosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *144*, 138–153.
- (7) El-aal, M. A. A.; Al-ghobashy, M. A.; Abdel, F.; Fathalla, A.; El-saharty, Y. S. Preparation and Characterization of PH-Responsive Polyacrylamide Molecularly Imprinted Polymer: Application to Isolation of Recombinant and Wild Type Human Serum Albumin from Biological Sources. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1046*, 34–47.
- (8) Ascenzi, P.; Masi, A.; Fanali, G.; Fasano, M. Heme-Based Catalytic Properties of Human Serum Albumin. *Cell Death Discov.* **2015**, No. 1.
- (9) Wasilewska, M.; Pomorska, A.; Adamczyk, Z.; Nattich-Rak, M.; Sadowska, M. Human Serum Albumin Adsorption Kinetics on Silica: Influence of Protein Solution Stability. *Langmuir* **2019**.
- (10) Anand, U.; Mukherjee, S. Binding, Unfolding and Refolding Dynamics of Serum Albumins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (12), 5394–5404.
- (11) 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* (3), 209–290.
- (12) van der Vusse, G. J. Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2009**, *24* (4), 300–307.

- (13) Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P. Binding of the General Anesthetics Propofol and Halothane to Human Serum Albumin: High Resolution Crystal Structures. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (49), 38731–38738.
- (14) Nemashkalova, E. L.; Permyakov, E. A.; Uversky, V. N.; Permyakov, S. E.; Litus, E. A. Effect of Cu²⁺ and Zn²⁺ Ions on Human Serum Albumin Interaction with Plasma Unsaturated Fatty Acids. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**.
- (15) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution. *Protein Eng. Des. Sel.* **1999**, *12* (6), 439–446.
- (16) Dos Santos, R.; Figueiredo, C.; Pina, A. S.; Barbosa, J. M.; Cec, A. Designed Affinity Ligands to Capture Human Serum Albumin. *J. Chromatogr. A* **2018**.
- (17) Arroyo, V.; García-Martinez, R.; Salvatella, X. Human Serum Albumin, Systemic Inflammation, and Cirrhosis. *J. Hepatol.* **2014**, *61* (2), 396–407.
- (18) Aze, D. C. G. Ischemia Modified Albumin: A Novel Biomarker for the Detection of Cardiac Ischemia. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2009**, *24* (4), 333–341.
- (19) José, M.; Turell, L.; Botti, H.; Antmann, L.; Carballal, S. Modulation of the Reactivity of the Thiol of Human Serum Albumin and Its Sulfenic Derivative by Fatty Acids. **2012**, *521*, 102–110.
- (20) Fanali, G.; Cao, Y.; Ascenzi, P.; Fasano, M. Mn (II) Binding to Human Serum Albumin : A 1 H-NMR Relaxometric Study. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 198–203.
- (21) Co, C.; Sadler, P. J.; Tucker, A.; Viles, J. H. Involvement of a Lysine Residue in the N-Terminal Ni²⁺ + and Cu²⁺ + Binding Site of Serum Albumins. **1994**, *200*, 193–200.
- (22) Blindauer, C. A.; Harvey, I.; Bunyan, K. E.; Stewart, A. J.; Sleep, D.; Harrison, D. J.; Berezenko, S.; Sadler, P. J. Structure , Properties , and Engineering of the Major Zinc Binding Site on Human Albumin. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (34), 23116–23124.
- (23) Tayyab, S.; Francis, J. A.; Kabir, M. Z.; Ghani, H.; Mohamad, S. B. Probing the Interaction of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid with Human Serum Albumin as Studied by Experimental and Computational Approaches. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *207*, 284–293.
- (24) Anguizola, J.; Wa, C.; Koke, M.; Barnaby, O. S.; Matsuda, R.; DeBolt, E.; Hoy, K. S.; Hage, D. S. Glycation of Human Serum Albumin. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *425*, 64–76.
- (25) Sola, D.; Rossi, L.; Schianca, G. P. C.; Maffioli, P.; Bigliocca, M.; Mella, R.; Corlianò, F.; Paolo Fra, G.; Bartoli, E.; Derosa, G. Sulfonylureas and Their Use in Clinical Practice. *Arch. Med. Sci.* **2015**, *11* (4), 840–848.
- (26) Basiaga, S. B. G.; Hage, D. S. Chromatographic Studies of Changes in Binding of Sulfonylurea Drugs to Human Serum Albumin Due to Glycation and Fatty Acids. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878* (30), 3193–3197.

- (27) Musante, L.; Muschi, M.; Candiano, G.; Petretto, A.; Dimasi, N.; Del, P.; Urbani, A.; Rialdi, G.; Ghigerri, G. M. Characterization of Oxidation End Product of Plasma Albumin 'in Vivo.' *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *349*, 668–673.
- (28) Himmelfarb, J., M. E. Albumin Is the Major Plasma Protein Target of Oxidant Stress in Uremia. *Kidney Int.* **2001**, *60*, 358–363.
- (29) Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Navarrete, A.; Grune, T.; Simm, A. Redox Biology Role of Advanced Glycation End Products in Cellular Signaling. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 411–429.
- (30) Frolov, A.; Hoffmann, R. Identification and Relative Quantification of Specific Glycation Sites in Human Serum Albumin. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (6), 2349–2356.
- (31) Arques, S. Human Serum Albumin in Cardiovascular Diseases. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, *52* (3), 8–12.
- (32) KDIGO. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *J. Int. Soc. Nephrol.* **2013**, *3*, 1–150.
- (33) Rizzuti, B.; Bartucci, R.; Sportelli, L.; Guzzi, R. Fatty Acid Binding into the Highest Affinity Site of Human Serum Albumin Observed in Molecular Dynamics Simulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *579*, 18–25.
- (34) Del Giudice, A.; Galantini, L.; Dicko, C.; Pavel, N. V. The Effect of Fatty Acid Binding in the Acid Isomerizations of Albumin Investigated with a Continuous Acidification Method. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *168*, 109–116.
- (35) Coverdale, J. P. C.; Khazaipoul, S.; Arya, S.; Stewart, A. J.; Blindauer, C. A. Crosstalk between Zinc and Free Fatty Acids in Plasma. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2018**.
- (36) Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N. Crystal Structure of Human Serum Albumin Complexed with Fatty Acid Reveals an Asymmetric Distribution of Binding Sites. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5* (9), 827–835.
- (37) Schopfer, F. J.; Vitturi, D. A.; Jorkasky, D. K.; Freeman, B. A. Nitric Oxide Nitro-Fatty Acids : New Drug Candidates for Chronic Inflammatory and Fibrotic Diseases. **2018**, *79*, 31–37.
- (38) Groeger, A. L.; Freeman, B. A. Signaling Actions of Electrophiles: Anti-Inflammatory Therapeutic Candidates. *Mol. Interv.* **2010**, *10* (1), 39–50.
- (39) Rappaport, S. M.; Li, H.; Grigoryan, H.; Funk, W. E.; Williams, E. R. Adductomics : Characterizing Exposures to Reactive Electrophiles. *Toxicol. Lett.* **2012**, *213*, 83–90.
- (40) Freeman, B. A.; Baker, P. R. S.; Schopfer, F. J.; Woodcock, S. R.; Napolitano, A.; Ischia, M.; Woodcock, S. R.; Napolitano, A. Nitro-Fatty Acid Formation and Signaling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (23), 15515–15519.
- (41) Trostchansky, A.; Rubbo, H. Nitrated Fatty Acids : Mechanisms of Formation, Chemical Characterization, and Biological Properties. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44* (11), 1887–1896.

- (42) Schopfer, F. J.; Cipollina, C.; Freeman, B. A. Formation and Signaling Actions of Electrophilic Lipids. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5997–6021.
- (43) Li, Y.; Zhang, J.; Schopfer, F. J.; Martynowski, D.; Garcia-barrio, M. T.; Kovach, A.; Suino-powell, K.; Baker, P. R. S.; Freeman, B. A.; Chen, Y. E.; et al. Molecular Recognition of Nitrated Fatty Acids by PPAR Gamma. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (8), 865–867.
- (44) Kansanen, E.; Bonacci, G.; Schopfer, J.; Kuosmanen, S. M.; Tong, K. I.; Leinonen, H.; Woodcock, S. R.; Yamamoto, M.; Carlberg, C.; Ylä-herttua, S.; et al. Electrophilic Nitro-Fatty Acids Activate NRF2 by a KEAP1 Cysteine 151-Independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (16), 14019–14027.
- (45) Cui, T.; Schopfer, F. J.; Chen, K.; Ichikawa, T.; Baker, R. S.; Batthyany, C.; Balu, K.; Feng, X.; Patel, R. P.; Freeman, B. A.; et al. Nitrated Fatty Acids : Endogenous Anti-Inflammatory Signaling Mediators. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (47), 35686–35698.
- (46) Strong, L. E.; Hughes, W. L.; Mulford, D. J.; Ashworth, J. N.; Melin, M. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluid. **2001**, *338* (2), 1–17.
- (47) Johnston, A.; Adcock, W. The Use of Chromatography to Manufacture Purer and Safer Plasma Products. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2000**, *17* (1), 37–70.
- (48) Tanaka, K.; Shigueoka, E. M.; Sawatani, E.; Dias, G. A.; Arashiro, F.; Campos, T. C. X. B.; Nakao, H. C. Purification of Human Albumin by the Combination of the Method of Cohn with Liquid Chromatography. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **1998**, *31* (11), 1383–1388.
- (49) Shamekhi, S.; Raoufinia, R.; Mota, A.; Abdolalizadeh, J.; Keyhanvar, N.; Safari, F. Overview of Albumin and Its Purification Methods. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *6* (4), 495–507.
- (50) Cabrera-Crespo, J.; Gonçalves, V. M.; Martins, E. A. L.; Grellet, S.; Lopes, A. P. Y.; Raw, I. Albumin Purification from Human Placenta. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, *31* (2), 101.
- (51) Ding, Z.; Cao, X. Affinity Precipitation of Human Serum Albumin Using a Thermo-Response Polymer with an L-Thyroxin Ligand. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13*.
- (52) Denizli, A. Plasma Fractionation: Conventional and Chromatographic Methods for Albumin Purification Plazma. *Hacettepe J. Biol. Chem.* **2011**, *39* (4), 315–341.
- (53) Odunuga, O. O.; Shazhko, A. Ammonium Sulfate Precipitation Combined with Liquid Chromatography Is Sufficient for Purification of Bovine Serum Albumin That Is Suitable for Most Routine Laboratory Applications. *Biochem. Compd.* **2013**, *1* (1), 3.
- (54) Chen, Y. Y.; Lin, S. Y.; Yeh, Y. Y.; Hsiao, H. H.; Wu, C. Y.; Chen, S. T.; Wang, A. H. J. A Modified Protein Precipitation Procedure for Efficient Removal of Albumin from Serum. *Electrophoresis* **2005**, *26* (11), 2117–2127.

- (55) Miller, B. F. *Encyclopedia & Dictionary of Medicine, Nursing & Allied Health. Miller-Keane*; 1992.
- (56) Frerick, C.; Kreis, P.; Górak, A.; Melzner, D. Simulation and Optimisation of the Downstream Process for Purification of Human Serum Albumin by Using Ion Exchange Membrane Adsorbers. *Desalination* **2006**, *200* (1–3), 468–469.
- (57) Wang, C.; Bai, S.; Tao, S.; Sun, Y. Evaluation of Steric Exclusion Chromatography on Cryogel Column for the Separation of Serum Proteins. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1333*, 54–59.
- (58) Labrou, N. E. Dye-Ligand Affinity Chromatography for Protein Separation and Purification. In *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*; 2008; Vol. 147, pp 129–139.
- (59) Raoufinia, R.; Mota, A.; Nozari, S.; Maleki, L. A.; Abdolalizadeh, J. A Methodological Approach for Purification and Characterization of Human Serum Albumin. *J. Immunoass. Immunochem.* **2016**, *37* (6), 623–635.
- (60) Weiland, F.; Zammit, C.; Reith, F.; Hoffmann, P. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Native Proteins. *Electrophoresis* **2014**, *35* (12–13), 1893–1902.
- (61) Adkins, J. N.; Varnum, S. M.; Auberry, K. J.; Moore, R. J.; Angell, N. H.; Smith, R. D.; Springer, D. L.; Pounds, J. G. Toward a Human Blood Serum Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *1* (12), 947–955.
- (62) Anderson, L.; Anderson, N. G. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Human Plasma Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74* (12), 5421–5425.
- (63) Shihabi, Z. K. *CAPILLARY ELECTROPHORESIS: Clinical Applications*, 3rd ed.; Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Eds.; Elsevier Inc.: Oxford, 2005.
- (64) Kumar, D.; Banerjee, D. Methods of Albumin Estimation in Clinical Biochemistry: Past, Present, and Future. *Clin. Chim. Acta* **2017**, *469*, 150–160.
- (65) Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2000.
- (66) Ostatná, V.; Uslu, B.; Dogan, B.; Ozkan, S.; Paleček, E. Native and Denatured Bovine Serum Albumin. D.c. Polarography, Stripping Voltammetry and Constant Current Chronopotentiometry. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *593* (1–2), 172–178.
- (67) Paleček, E.; Tkáč, J.; Bartošík, M.; Bertók, T.; Ostatná, V.; Paleček, J. Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins. Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (5), 2045–2108.
- (68) Dumas, B. T.; Watson, W. A.; Biggs, H. G. Albumin Standards and the Measurement of Serum Albumin with Bromocresol Green. *Clin. Chim. Acta* **1997**, *31*, 87–96.
- (69) Choudhury, R.; Rajeshbhai Patel, S.; Ghosh, A. Selective Detection of Human Serum Albumin by near Infrared Emissive Fluorophores: Insights into Structure-Property Relationship. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2019**, *376*, 100–107.
- (70) Wu, Y.; Czarnik-Matusiewicz, B.; Murayama, K.; Ozaki, Y. Two-Dimensional

- Near-Infrared Spectroscopy Study of Human Serum Albumin in Aqueous Solutions: Using Overtones and Combination Modes to Monitor Temperature-Dependent Changes in the Secondary Structure. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *104* (24), 5840–5847.
- (71) Scaglione, F.; Alladio, E.; Damin, A.; Turci, F.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Bordiga, S.; Battezzati, L.; Rizzi, P. Functionalized Nanoporous Gold as a New Biosensor Platform for Ultra-Low Quantitative Detection of Human Serum Albumin. *Sensors Actuators, B Chem.* **2019**, *288*, 460–468.
- (72) Grebe, S. K. G.; Singh, R. J. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to from Here? *Clin. Biochem. Rev.* **2011**, *32*, 5–31.
- (73) Liu, G.; Zhao, Y.; Angeles, A.; Hamuro, L. L.; Arnold, M. E.; Shen, J. X. A Novel and Cost Effective Method of Removing Excess Albumin from Plasma/Serum Samples and Its Impacts on LC-MS/MS Bioanalysis of Therapeutic Proteins. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (16), 8336–8343.
- (74) Beasley-Green, A.; Burris, N. M.; Bunk, D. M.; Phinney, K. W. Multiplexed LC-MS/MS Assay for Urine Albumin. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (9), 3930–3939.
- (75) Petitpas, I.; Grüne, T.; Bhattacharya, A. A.; Curry, S. Crystal Structures of Human Serum Albumin Complexed with Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314* (5), 955–960.
- (76) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685.
- (77) Ornstein, L. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *121* (2), 321–349.
- (78) Davis, B. J. Disc Electrophoresis – II Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *121* (2), 404–427.
- (79) Mascarenhas, R. J.; Namboothiri, I. N.; Sherigara, B. S.; Mahadevan, K. M. The Electrochemical Behaviour of Novel Multifunctional Alpha-Hydroxymethylated Nitroalkenes at Glassy Carbon and Wax Impregnated Carbon Paste Electrodes. *Croat. Chem. Acta* **2007**, *80* (1), 53–59.
- (80) Squella, J.; Bollo, S.; Nunez-Vergara, L. Recent Developments in the Electrochemistry of Some Nitro Compounds of Biological Significance. *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9* (6), 565–581.
- (81) Havran, L.; Billová, S.; Palecek, E. Electroactivity of Avidin and Streptavidin. Avidin Signals at Mercury and Carbon Electrodes Respond to Biotin Binding. *Electroanalysis* **2004**, *16* (13–14), 1139–1148.
- (82) Havlikova, M.; Zatloukalova, M.; Ulrichova, J.; Dobes, P.; Vacek, J. Electrocatalytic Assay for Monitoring Methylglyoxal-Mediated Protein Glycation. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (3), 1757–1763.
- (83) Vacek, J.; Svrckova, M.; Zatloukalova, M.; Novak, D.; Proskova, J.; Langova, K.; Galuszkova, D.; Ulrichova, J. Electrocatalytic Artificial Carbonylation Assay for Observation of Human Serum Albumin Inter-Individual Properties. *Anal. Biochem.* **2018**, *550*, 137–143.

- (84) Goodman, D. W. S. The Interaction of Human Serum Albumin with Long-Chain Fatty Acid Anions. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (15), 3892–3898.
- (85) Vitturi, D. A.; Chen, C. S.; Woodcock, S. R.; Salvatore, S. R.; Bonacci, G.; Koenitzer, J. R.; Stewart, N. A.; Wakabayashi, N.; Kensler, T. W.; Freeman, B. A.; et al. Modulation of Nitro-Fatty Acid Signaling Prostaglandin Reductase-1 Is a Nitroalkene Reductase. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (35), 25626–25637.
- (86) Batthyany, C.; Schopfer, F. J.; Baker, P. R. S.; Dura, R.; Baker, L. M. S.; Huang, Y.; Cerven, C.; Branchaud, B. P.; Freeman, B. A. Reversible Post-Translational Modification of Proteins by Nitrated Fatty Acids in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (29), 20450–20463.