

СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН: СТРУКТУРА И ТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ

(обзор литературы)

Пшенкина Н.Н.

ФГБОУ ВПО "Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова" МО РФ

194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Тел. (812) 542-35-07

E-mail: pshenkina@mail.ru

Резюме. В обзоре рассмотрены современные представления о структуре сывороточного альбумина человека в контексте его роли в транспорте лекарственных веществ. Охарактеризованы основные центры связывания лигандов и жирных кислот. Рассмотрено значение механизмов регуляции связывания лигандов для диссоциации лиганд-альбуминового комплекса в процессе транспорта лекарств из крови в ткани. В заключении обозначены некоторые перспективные направления дальнейших исследований в области изучения структуры и функций альбумина, а также их практического использования.

Ключевые слова: альбумин, структура, связывание, доставка, лекарственные вещества, жирные кислоты.

SERUM ALBUMIN: STRUCTURE AND CARRYING FUNCTION

(Review)

Pshenkina N.N.

Military Medical Academy named after S.M. Kirov,

Academic Lebedev str., 6, Saint Petersburg, 194044, Russia

Tel. +7 (812) 542-35-07

E-mail: pshenkina@mail.ru

Abstract. Modern advances in research of structure and function of human serum albumin relating to drug carrying are reviewed. The main drugs' binding sites are characterized. Regulation of drug binding and dissociation of ligand-protein complexes during drugs' transfer to tissues are considered. In conclusion, prospective areas of further investigations of albumin structure and functions are proposed and possible ways of practical application are considered as well.

Key words: albumin, structure, binding, drug delivery, drugs, fatty acids.

Сывороточный альбумин, помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, выполняют важную функцию, осуществляя транспорт эндогенных и экзогенных субстанций [11, 84]. В основе транспортной функции альбумина лежит способность к обратимому связыванию лигандов различной химической структуры, таких как биологически активные вещества [15], жирные кислоты [41, 110], неорганические ионы [67], а также лекарственные вещества (ЛВ) и их метаболиты [55, 61, 111, 112]. Благодаря связыванию повышается растворимость лигандов в плазме крови, снижается их токсичность, осуществляется защита связанных соединений от ферментативной и окислительной деградации. Вместе с тем, связывание ЛВ с альбумином вносит существенный вклад в фармакокинетику лекарств, оказывая влияние на параметры их распределения и элиминации. В связи с этим молекулярные аспекты лиганд-альбуминовых взаимодействий неизменно находятся в поле зрения специалистов, занимающихся проблемами фармакокинетики, лекарственных взаимодействий, а также разработкой новых лекарственных препаратов.

Структура сывороточного альбумина

Альбумин относится к одному из наиболее изученных протеинов млекопитающих, молекулярная структура которого полностью расшифрована [21, 57, 84]. Сывороточный альбумин человека (HSA, human serum albumin) является одноцепочечным белком, состоящим из 585 аминокислотных остатков, и имеет М.м. 66,5 кДа. Кристаллографический анализ HSA и его рекомбинантных форм (rHSA) показал, что полипептидная цепь образует асимметричную глобулу в форме сердца с размерами приблизительно $80 \times 80 \times 30$ Å, на 67% спирализованную в α -спираль (рис. 1). Рентгеноструктурный анализ показал, что белок состоит из трех похожих доменов (I–III), каждый из которых включает по два субдомена (А и В). Субдомен А образован шестью, а субдомен В – четырьмя α -спиралями, связанными в гибкие петли [100]. Все цистеиновые остатки (кроме Цис-34) связаны дисульфидными связями.

Несмотря на многообразие переносимых веществ, существует ограниченное число типов мест связывания на молекуле альбумина, в идентификации которых основополагающей считается работа G. Sudlow и соавт. [99]. Исследуя вытеснение специфических флуоресцентных маркеров из связывания с альбумином, авторы выделили 2 центра связывания лигандов на молекуле белка, которые впоследствии получили название центров (участков) I и II по Sudlow (рис. 1).

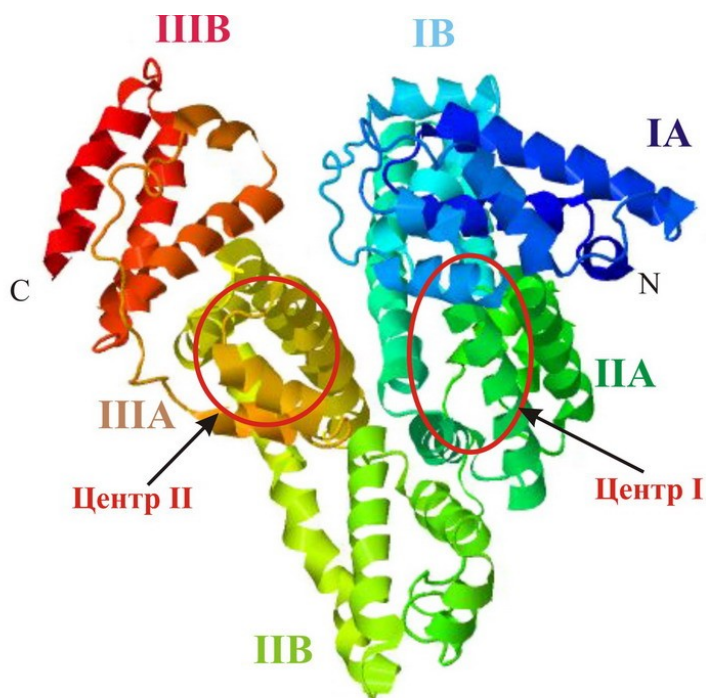


Рис. 1. Структура сывороточного альбумина человека (PDB код: 1bm0) [91, 100].

На рисунке обозначено подразделение альбумина на домены (I-III) и субдомены (A и B), а также примерная локализация центров I и II по Sudlow.

Кристаллографический анализ комплексов альбумина с различными лекарственными веществами и эндогенными соединениями позволил установить структуру обоих связывающих центров и выявить аминокислотные остатки в молекуле белка, играющие ключевую роль в процессе связывания лигандов [42]. В дальнейшем были идентифицированы дополнительные центры связывания лигандов, распределенные по всей молекуле альбумина, а также участки связывания жирных кислот [21]. Вместе с тем, в отношении лекарственных веществ до настоящего времени наиболее распространенной является классификация центров связывания по Sudlow. Маркерами центра I являются варфарин, иодипамид, фенилбутазон, азапропазон, билирубин; маркерами центра II служат триптофан, диазепам, ибупрофен. Обычно лиганды связываются с одним или с небольшим количеством центров связывания с константами взаимодействия порядка 10^4 – 10^6 М⁻¹. Основные лиганды и константы их высокоизбирательного связывания с центрами I и II на молекуле HSA приведены в таблице.

Таблица

**Высокоизбирательное связывание лигандов с центрами I и II
сывроточного альбумина человека**

Центр I	K_I (M ⁻¹) *	Ссылки	Центр II	K_I (M ⁻¹)	Ссылки
<i>Лекарственные вещества</i>					
Варфарин	$3,4 \times 10^5$	[84, 115]	Диазепам	$3,8 \times 10^5$	[60, 84]
Азапропазон	$2,8 \times 10^5$	[39, 71]	Дансилсаркозин	$7,6 \times 10^5$	[106, 107]
Аценокумарин	$2,2 \times 10^5$	[115]	Диклофенак	$3,3 \times 10^6$	[117]
Бензилтиоурацил	$4,1 \times 10^4$	[119]	Ибупрофен	$2,7 \times 10^6$	[57, 96]
Вальпроат	$2,8 \times 10^5$	[104]	Имипрамин	$1,6 \times 10^5$	[118]
Верапамил	$1,4 \times 10^4$	[68]	Йопаноат	$6,7 \times 10^6$	[73, 83]
Дансиласпарагин	$1,5 \times 10^5$	[115]	Карпрофен	$4,4 \times 10^6$	[93]
Индометацин	$1,4 \times 10^6$	[73, 84]	Кетопрофен	$2,5 \times 10^6$	[31, 94]
Йодипамид	$9,9 \times 10^6$	[115]	Клофибрат	$7,6 \times 10^5$	[70, 84]
Йофеноксат	$7,7 \times 10^7$	[84]	Пирпрофен	$3,9 \times 10^5$	[81]
Кверцетин	$2,7 \times 10^5$	[24]	Хлортиазид	$5,5 \times 10^4$	[103]
Оксифенбутазон	$3,4 \times 10^5$	[69]	Цефаклор	$1,2 \times 10^2$	[75]
Пиретанид	$9,5 \times 10^4$	[101]	Цефалексин	$4,3 \times 10^3$	[75]
Спиринолактон	$3,0 \times 10^3$	[102]	Этакринат	$1,7 \times 10^6$	[19, 84]
Сульфадиметоксин	$9,0 \times 10^4$	[82]	S-напроксен	$3,7 \times 10^6$	[23, 84]
Сульфатиазол	$2,5 \times 10^4$	[59]			
Теноксикам	$3,7 \times 10^5$	[25]			
Толбутамид	$4,0 \times 10^4$	[84, 109]			
Фенилбутазон	$1,5 \times 10^6$	[84, 115]			
Фуросемид	$1,9 \times 10^5$	[101]			
Хлорпропамид	$3,3 \times 10^5$	[59, 84]			
<i>Эндогенные соединения</i>					
Билирубин	$9,5 \times 10^7$	[26, 85]	Октаноат	$1,6 \times 10^6$	[60]
Эйкозаноиды	нд	[60]	L-триптофан	$4,4 \times 10^4$	[60]
			Индолилсульфат	$1,6 \times 10^6$	[50]
			Индол-3-ацетат	$2,1 \times 10^5$	[50]
			L-тироксин	$3,0 \times 10^5$	[62, 84]
			Гиппурат	$1,0 \times 10^4$	[50]

Примечание:

* - K_I высокоизбирательная константа связывания при pH 7,4.

Центр I. В кристаллической структуре HSA или gHSA участок I имеет вид кармана в субдомене ПА (рис. 1) и содержит единственный в молекуле альбумина человека остаток триптофана – Трп-214. Гидрофобные участки белковой цепочки обращены во внутреннюю полость кармана; вход в карман окружен положительно заряженными аминокислотными остатками [100]. Типичные лиганды I центра связывания представляют собой дикарбоновые кислоты и (или) крупные гетероциклические молекулы с отрицательным зарядом, локализованным в центре молекулы. Флуоресцентными маркерами I центра являются 5-диметиламино-нафталин-1-сульфонамид (DNSA), дансиламид, дансиласпарагин, дансил-L-лизин, дансил-L-аспарагин, дансил-L-глутамин и *n*-бутил-*p*-аминобензойная кислота [29, 95]. В качестве альтернативных маркеров центра I в последнее время предлагаются также производные кумарина [52].

Центр I является довольно обширным, поскольку связывает такие крупные молекулы, как билирубин. Кроме того, описаны случаи одновременного связывания участком I двух и более различных лигандов [59, 121]. Тот факт, что лиганды различной химической структуры связываются центром I с высоким сродством, говорит о значительной гибкости данного участка [59, 84]. Petersen C.E. et al. исследовали связывание билирубина восьмью разновидностями gHSA, измененного по одному из аминокислотных остатков, и отметили множество вариантов обоюдного влияния лигандов на связывание друг друга [85]. Предполагается, что в основе подобного влияния лежит частичное перекрывание мест связывания, что может произойти вследствие конформационных перестроек молекулы альбумина. Изменение одного аминокислотного остатка в I участке gHSA оказывает более значительное влияние на конформационную и температурную стабильность белка, чем подобное изменение во II участке [113, 114].

Таким образом, участок I представляется обширным и подвижным, имеющим большое число индивидуальных мест связывания, которые иногда независимы друг от друга, а в ряде случаев могут оказывать взаимное влияние. Для более детальной характеристики участка были сделаны попытки его разделения на отдельные фрагменты [40, 58, 115]. Так, Fehske K.J. et al. предложили рассматривать центр I как область связывания, состоящую из двух подцентров – варфаринового (маркеры – варфарин, иодипамид, сульфадиметоксин, фенопрокумон) и азапропазонового (маркеры – фенилбутазон, азапропазон, глибенкламид) [40]. Предложение авторов мотивировано тем, что при различных заболеваниях связывание с двумя подцентрами этой области нарушается в разной степени. Дальнейшие исследования показали, что центр I может

связывать более двух лигандов, кроме того, он перекрывается с центром связывания жирных кислот [21, 121].

Центр II локализован в субдомене IIIA (рис. 1) и представляет собой карман 0,6-0,8 нм в ширину и 1,2-1,6 нм в длину с катионной группой на поверхности, которая образована остатками Лиз-194 и Арг-145 [83, 100]. Среди аминокислотных остатков в нем важную роль играют Арг-410 и Тир-411. Это проявляется, например, при связывании кетопрофена. Вместе с тем, в связывании диазепама Арг-410 не участвует [114].

Для связывания с центром II важную роль играют размеры молекулы, при этом положительный заряд лиганда препятствует связыванию, однако наличие отрицательного заряда не является обязательным. Так, диазепам – основание, но с низким рКа. В физиологических условиях он неионизирован и хорошо связывается с центром II, так как по структуре хорошо вписывается в гидрофобную область центра. Лиганды, взаимодействующие с центром II, так называемым индол-бензодиазепиновым участком, в большинстве своем – ароматические карбоновые кислоты, в которых отрицательно заряженная концевая карбоксигруппа находится достаточно далеко от гидрофобного центра молекулы лиганда (например, нестероидные противовоспалительные средства). Флуоресцентными зондами II центра являются дансилсаркозин, дансил-L-пролин, дансилглицин и 7-алкиламинокумарин-4-ацетат [29, 95].

Центр II меньше и уже центра I, так как ни один из крупных лигандов (например, билирубин, гемин, гематин и др. порфирины) не связывается с ним. Центр II менее подвижен, чем центр I, так как связывание лигандов на этом участке часто стереоселективно. Так, например, L-триптофан связывается альбумином со сродством примерно в 100 раз больше, чем D-изомер аминокислоты. Кроме того, установлено, что замещение у лиганда относительно небольшой группы может сильно повлиять на связывание. Замещение метильной группы на водород в L-триптофане приводит к утрате способности к связыванию [84]. Таким образом, для связывания лигандов на участке II имеется больше ограничений, чем на участке I.

Дополнительные участки. Несмотря на то, что выделение центров I и II, предложенное Sudlow, является достаточно удачным, на молекуле альбумина имеются и другие участки связывания лигандов.

Так, Bhattacharya A.A. et al. в результате кристаллографического исследования комплексов HSA с пропофолом или галотаном выделили дополнительные центры связывания анестетиков [20]. Альбумин связывает две молекулы пропофола, одну – в области субдомена IIIA, а другую – в области субдомена IIIB. Участок связывания в

субдомене IIIA перекрывает Sudlow центр II (диазепам, ибупрофен). Участок связывания в субдомене IIIB часто выделяют в отдельный центр III, или центр связывания пропофола. Вместе с тем, связывание пропофола с первым из перечисленных центров является более избирательным, и в концентрациях, близких к фармакологическим *in vivo*, анестетик связывается преимущественно с субдоменом IIIA (центр II).

Галотан в низких концентрациях и при отсутствии ЖК связывается с тремя участками молекулы альбумина. Два из них расположены в области перекрытия IIA/IIIB субдоменов, а третий – в субдомене IIIA в области Sudlow центра II [20]. В высоких концентрациях и в присутствии миристата галотан вытесняет миристал из центров связывания жирных кислот FA6, FA7 и FA8, в результате к альбумину присоединяется еще 4 молекулы анестетика (всего 7). Однако фармакологически значимыми, по-видимому, являются первые три из перечисленных участков, поскольку концентрации, требуемые для связывания всех 7 молекул, в физиологических условиях не достигаются.

Помимо анестетиков, дополнительные центры связывания описаны и для ряда других лигандов, однако, как правило, эти взаимодействия отличаются низким сродством [27, 48].

Жирные кислоты. Жирным кислотам (ЖК) принадлежит важная роль в регуляции связывающей способности альбумина. В нормальных физиологических условиях молекула альбумина содержит 2-4 молекулы ЖК, концентрации которых в сыворотке крови варьируют в широких пределах [110]. Кристаллографический анализ позволил установить локализацию и архитектуру центров связывания ЖК, среди которых средне- и длинноцепочечные насыщенные ЖК (с длиной цепи C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ и C₁₈), а также две ненасыщенные ЖК – олеиновая (C_{18:1}) и арахидоновая (C_{20:4}) [32, 34, 88].

Идентифицировано 7 основных центров связывания ЖК, которые распределены по всей поверхности молекулы альбумина, и получили условные обозначения FA1 – FA7. Эти участки связывают как среднецепочечные, так и длинноцепочечные ЖК. Среднецепочечные ЖК связываются еще и на дополнительных сайтах альбумина, образуя в общей сложности до 11 различных локусов связывания [21]. На рис. 2 представлен комплекс HSA с 8 молекулами миристиновой кислоты (C_{14:0}), относящейся к среднецепочечным ЖК. Основные 7 связывающих центров ЖК имеют значительные топологические различия и содержатся, как правило, внутри одного из субдоменов и перекрываются с близлежащими доменами или субдоменами [97]. Эти особенности локализации центров связывания ЖК создают предпосылки для их аллостерического влияния на взаимодействие альбумина как с другими лигандами, так и с самими ЖК.

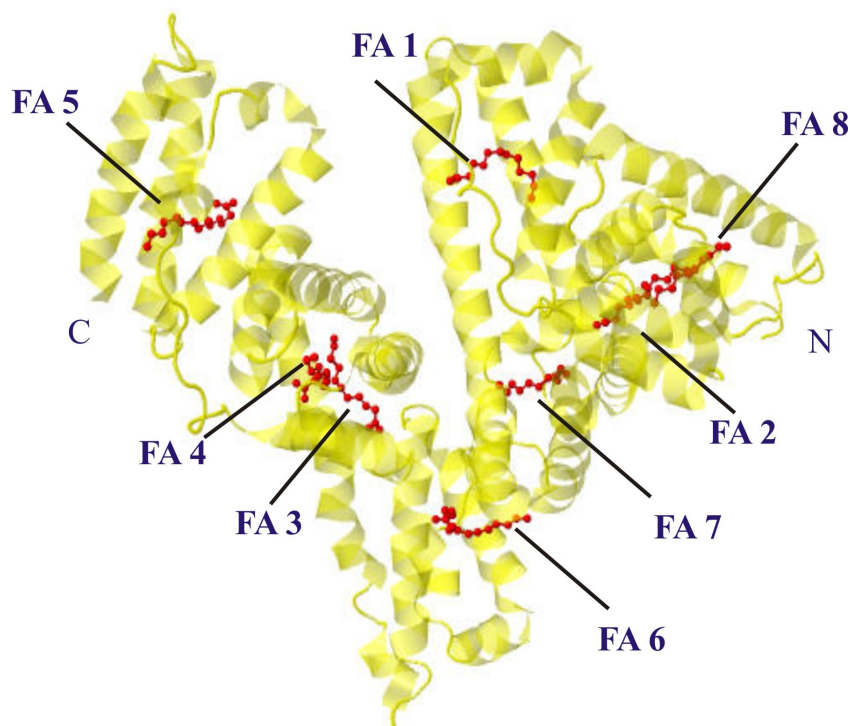


Рис. 2. Кристаллическая структура комплекса альбумина с миристиновой кислотой (PDB код: 1e7g) [21, 91].

FA1-FA8 – соответствующие центры связывания миристана.

Центр FA1 образует солевой мостик с Арг-117, который находится в составе полипептидной петли, связывающей субдомены IB-IIA. FA2 устанавливает водородную связь с Тир-150 из субдомена IB и с Арг-257 и Сер-287 из субдомена IIA. Уникальность центра FA2 состоит в том, что его локализация объединяет три субдомена: IA, IB и IIA. FA3 и FA4 находятся в большой впадине субдомена IIIA, которая составляет основу Sudlow центра II связывания лигандов (диазепам, ибупрофен). FA3 образует солевые мостики с Арг-348 и Арг-485, водородную связь с Сер-342; FA4 – солевые мостики с Арг-410 и водородные связи с Тир-411 и Сер-489. FA5 локализован в субдомene IIIB с ориентацией полярных остатков в сторону субдомена IIIA и фиксируется солевыми и водородными связями с Тир-401 и Лиз-525. В отличие от них центры FA6 и FA7 не имеют признаков полярных взаимодействий, которые способствовали бы закреплению полярной головки ЖК на молекуле альбумина. В связи с этим, считается, что центры FA6 и FA7 обладают низким сродством. Важно отметить, что центр FA7 локализован в непосредственной близости и даже перекрывает Sudlow центр I связывания лигандов (варфариновый) [21, 32, 45, 87].

При взаимодействии с центрами FA1 – FA5 карбоксильная головка ЖК фиксируется за счет электростатических/полярных взаимодействий у входа в карман, а

метиленовый «хвост» распределяется внутри кармана, в результате происходит некоторое расширение оккупированного домена [21, 35]. При связывании с длинными и узкими участками FA2, FA4, FA5 и FA6 длинноцепочечные ЖК линейно заполняют пространство кармана, в то время как на участках FA1, FA3 и FA7, которые короче и более широкие, длинные метиленовые хвосты огибают контур кармана [30].

Хотя большинство связывающих центров предсуществуют в структуре альбумина, для взаимодействия ЖК со всеми 7 участками в полном объеме необходим ряд существенных конформационных перестроек.

Аллостерическая регуляция связывания лигандов. Гибкость молекулы альбумина и чрезвычайная конформационная лабильность создает предпосылки для реализации аллостерических влияний со стороны разнообразных соединений на связывание лигандов с белком [12, 38]. Например, установлена перекрестная регуляция связывания гема с гем-связывающим участком и лигандов с Sudlow центром I. Так, при взаимодействии варфарина с центром I сродство гема к своему участку снижается на порядок. В такой же мере снижается сродство варфарина к центру I на фоне предварительного связывания гема с гем-связывающим участком. Напротив, связывание ибупрофена с центром II не влияет на связывание гема, и наоборот [12, 15, 17].

Аллостерические взаимодействия описаны для связывания с альбумином ибупрофена, варфарина и лоразепама [12, 14, 77]. Так, связывание ибупрофена изменяет характер взаимодействия лоразепама, с другой стороны, связывание лоразепама оказывает влияние на взаимодействие с белком варфарина. Карбамазепин напрямую конкурирует с L-триптофаном за связывание с Sudlow центром II, но аллостерически взаимодействует с лигандами, связывающимися с Sudlow центром I и с дигитоксиновым центром [56].

Эффективными аллостерическими регуляторами связывающей способности альбумина являются ЖК. Миристиновая кислота регулирует свойства альбумина комплексно, вовлекая конкурентные и аллостерические механизмы. С одной стороны, связывание варфарина с центром I вытесняет ЖК из участка связывания FA7, при связывании ибупрофена со II центром происходит вытеснение ЖК из участков FA3 и FA4, а при связывании гема со своим центром вытесняются ЖК из места связывания FA1. С другой стороны, значительные конформационные перестройки в молекуле альбумина возникают после связывания с белком миристиновой кислоты. Так, добавление к альбумину трех эквивалентов этой среднецепочечной ЖК значительно повышает связывание лигандов с Sudlow центром I (перекрывающимся с FA7). Это объясняют кооперативным эффектом, возникающим в результате взаимодействия ЖК с доменом III,

то есть с участками FA4 и FA5. В то же время при добавлении миристата в концентрациях, превышающих три эквивалента, происходит связывание ЖК с участком FA2, что приводит к уменьшению сродства варфарина к центру I [13, 41].

Аллостерические взаимодействия вовлечены в формирование и новых центров связывания лигандов. Кристаллографические исследования показали, что для связывания с альбумином 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT; используется для лечения ВИЧ-инфекции), необходимо предварительное связывание миристата с молекулой белка. В результате конформационных перестроек внутри центра I формируется подцентр, служащий местом связывания AZT. Более того, в результате данных конформационных перестроек в пределах центра I, помимо AZT-подцентра, формируются еще два подцентра для связывания салицилата и индометацина [121].

Гормон щитовидной железы тироксин связывается с Sudlow центрами I и II, а также с двумя центрами в субдомене IIIB. Хотя ЖК конкурируют с тироксином на всех четырех центрах связывания, они индуцируют конформационные изменения в молекуле альбумина, создавая тем самым пятый центр связывания лиганда в области щели между доменами I и III. Мутация по аминокислотному остатку Арг-218, расположенному внутри Sudlow центра I, приводит к нарушению связывания тироксина и является причиной семейной дисальбуминемии, сопровождающейся гипертироксинемией [86, 89].

Другой клинически значимый пример аллостерического взаимодействия – влияние гема на связывание лигандов. При патологических состояниях, связанных с разрушением гемоглобина (например, при гемолитической анемии, при травме), может происходить высвобождение значительного количества гемовых структур. Связывание гема с альбумином приводит к уменьшению сродства альбумина к лигандам, взаимодействующим с центром I [12]. В результате уменьшается прочность связывания с альбумином таких лекарств как хлорпропамид, дигитоксин, фуросемид, индометацин, фенилбутазон, сульфизоксазол и толбутамид. Если учесть, что для многих ЛВ степень связывания с альбумином составляет 90% и выше, увеличение содержания в крови свободных лекарственных соединений может вызвать симптомы передозировки [18, 33, 63].

Изменения в связывании ЛВ альбумином могут приводить к изменению их фармакокинетических свойств. Эта опасность особенно возрастает в случае конкуренции двух или более ЛВ за один и тот же участок связывания. Тем не менее, чаще всего повышение несвязанной фракции ЛВ гораздо меньше, чем это можно ожидать, поскольку большая часть вытесненного препарата повторно связывается на другом участке

молекулы альбумина. Например, большая часть карпрофена, конкурентно вытесненного из участка II ибупрофеном, повторно связывается на I участке [92]. Такое же перемещение из участка II на участок I наблюдали и для диклофенака в присутствии ибупрофена [116].

Доставка лекарств в ткани

Связывание ЛВ с белками плазмы и компонентами тканей является важнейшим фармакокинетическим параметром, определяющим распределение и элиминацию лекарств. Степень связывания, в частности с альбумином как наиболее представленным транспортным белком крови, в значительной мере определяет ход кривой, отражающей зависимость концентрации ЛВ в крови от времени после его введения. Благодаря связыванию с альбумином растворимость лекарств в крови значительно превышает их растворимость в чистом виде. Таким образом, альбумин выступает в роли своего рода сорбента, создающего депо лекарственных веществ, защищающего их от деградации и доставляющего к тканевым мишеням, предотвращая неспецифическое рассеяние лекарств в процессе транспортировки.

Считается, что фармакологически активным является пул свободного ЛВ, несвязанного с белком. Сводный лиганд, растворенный в плазме крови, путем диффузии или при участии переносчиков поступает в ткани, где взаимодействует со специфическими тканевыми мишенями. В связи с этим, многие авторы считают, что наиболее показательным служит содержание в плазме крови свободного лекарства, тогда как суммарное его содержание является малоинформативным [3, 98, 108]. Не подвергая сомнению постулат об участии свободной фракции ЛВ в процессах массопереноса между кровью и тканями, хотелось бы отметить, что транспорт лекарств из крови в ткани носит гораздо более сложный характер.

Степень связывания с альбумином для многих лекарств достаточно высока. Так, 99% диклофенака, фуросемида или кеторолака циркулирует в крови в связанном виде [37]. Соответственно, свободная фракция данных ЛВ составляет всего 1% от общего содержания в кровотоке. При таком объеме активно обменивающейся фракции можно ожидать, что фармакологический эффект от введения лекарств будет ничтожным. Однако, как показывают данные фармакокинетики, время полужизни для перечисленных соединений составляет около 2 ч [37], то есть за этот период из крови уходит половина суммарного циркулирующего препарата, а с течением времени лекарственное вещество исчезает из крови полностью. Из этого следует, что доставке из крови в ткани подлежит не только свободный препарат, но и все лекарственное вещество, находящееся в крови.

Большинство авторов считают, что движущим фактором перехода ЛВ из крови в ткани является стремление к достижению равновесных концентраций несвязанных ЛВ между кровью и тканями [66]. В этой связи для расчета и прогнозирования фармакокинетических параметров, в том числе объема распределения ЛВ, предлагается использовать содержание несвязанного лекарства в плазме крови и в тканях [99]. Полагают, что равновесные концентрации в органах достигаются очень быстро. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению пула свободного (несвязанного с альбумином) лекарства в крови, который пополняется за счет дополнительной диссоциации лиганд-альбуминового комплекса. С другой стороны, в тканях происходит постоянная убыль концентрации свободного лиганда в результате его связывания с тканевыми мишенями либо за счет деградации. В результате поток свободного лиганда направлен в сторону его меньшего содержания вплоть до установления состояния равновесия.

Tanaka H. и Mizojiri K., исследуя проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для ряда ЛВ с помощью метода перфузии *in situ*, установили, что фракция лекарства, которая проникает в головной мозг через ГЭБ, представляет собой не только фракцию свободного лиганда, но и фракцию ЛВ, диссоциирующего в процессе перфузии [105]. Сумма этих двух фракций *in vivo*, обозначенная авторами как кажущаяся обменная фракция (apparent exchangeable fraction), составила для диазепама 96,5%, для кофеина – 100%, для пропранолола – 33,1%. Эти значения существенно превышают величины, получаемые обычно в опытах *in vitro* при оценке фракции свободных лигандов. Так, для диазепама, согласно результатам определения степени связывания, доля свободной фракции составляет лишь 2%, для кофеина – 64%, а для пропранолола – 5÷10% [10, 37]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные о степени связывания лигандов с альбумином, полученные в опытах *in vitro* или при анализе образцов крови, полученных из магистрального кровотока, не совсем адекватно характеризуют размер эффективно обменивающегося с тканями пула ЛВ.

Аналогичный эффект наблюдали Baker M. и Parton T. при исследовании влияния белкового связывания на захват ЛВ гепатоцитами [16]. Интенсивность захвата ЛВ гепатоцитами была в 3,4 раза выше той, которая ожидалась, исходя из определяемой доли свободного препарата. Авторы высказали предположение, что связывание лиганда с альбумином в микроциркуляторном русле ослабевает, либо происходит постоянное пополнение фракции свободного лиганда за счет связанного.

Полученные результаты указывают на то, что в микрокапиллярах в процессе циркуляции лиганд-альбуминовый комплекс подвергается усиленной диссоциации под

влиянием динамических условий кровотока. Хотя механизм этого влияния исчерпывающе не исследован, предполагают, что одним из факторов, усиливающих диссоциацию лиганд-протеинового комплекса, может служить конформационное изменение структуры альбумина в результате контакта с клетками эндотелия или с гепатоцитами [49, 105].

Предпосылками к тому, что микроциркуляторном русле доля свободного лиганда может существенно отличаться от таковой в магистральном кровотоке, служат чрезвычайная гибкость молекулы альбумина, способность молекулы к скручиванию и раскручиванию (folding/unfolding), а также восприимчивость к разного рода регуляторным влияниям [22, 54, 79]. В области pH от 6 до 9 альбумин подвержен pH-зависимым конформационным изменениям, которые получили название нейтрально-основного, или N→B перехода [2, 46, 122]. Этот переход вызывает дальнейшее увеличение различий между центрами I и II. Подобные конформационные переходы сопровождаются изменением сродства связывающих центров. Другой конформационный переход альбумина наблюдается при изменении температуры в интервале 35–37°C [6]. Температура влияет на связывание ряда порфиринов, фенобарбитала и фенитоина [4]. Ионная сила раствора и ионный состав, помимо конформационного влияния на альбумин, оказывает также действие на связывание заряженных лигандов с белком. Показано также, что ионы хлора аллостерически уменьшают связывание органических анионов с альбумином, а ионы Ca^{2+} повышают степень взаимодействия пипольфена и супрастина с HSA [1, 51]. Нямаа Д. и соавторы в серии работ показали, что сравнительно небольшие изменения pH, температуры, ионной силы и ионного состава плазмы и тканевой жидкости могут служить эффективными системными регуляторами транспортной функции сывороточного альбумина [5-8].

Перспективные направления дальнейших исследований

За многолетний период интенсивных исследований структуры и функции альбумина достигнуты колоссальные успехи в расшифровке молекулярной структуры белка, его пространственной организации, раскрытии механизмов взаимодействия с лигандами, идентификации связывающих центров, установлении роли и многообразия факторов, оказывающих регуляторное влияние на структуру и функции альбумина, в том числе роль жирных кислот, а также установлен ряд других фактов, имеющих фундаментальное и прикладное значение. Вместе с тем, нельзя сказать, что в области исследования альбумина все проблемы решены. Не претендуя на полноту отражения перспективных направлений исследований в этой области, хотелось отметить следующие:

1. Дальнейшее изучение взаимодействия лигандов с альбумином, включая механизмы регуляции, роль конформационных перестроек, а также исследование новых типов взаимодействий, как, например, связывание альбумина и лидокаина, при котором одна молекула лиганда взаимодействует с двумя молекулами белка [27, 48].
2. Исследование связывания с альбумином нескольких лигандов и их взаимное влияние на взаимодействие с белком, а также на свойства самого альбумина. Это направление представляется чрезвычайно значимым в практическом отношении для анализа лекарственных взаимодействий.
3. Взаимодействие альбумина с наноматериалами. Исследование фармакокинетики новых лекарственных препаратов, созданных на основе наноматериалов, требует анализа их взаимодействия с транспортными системами крови, в частности с альбумином. Имеются данные о высокоизбирательном связывании фуллерена C_{60} и наночастиц золота с HSA [53, 78], а также о влиянии углеродных нанотрубок на структуру самого альбумина [120].
4. Использование альбумина как средства направленной доставки лекарств. Привлекательным направлением является использование естественной транспортной способности альбумина в целях адресной доставки лигандов, в частности, к опухолям и очагам воспаления [76, 90]. Для повышения избирательности доставки прибегают к созданию рекомбинантных форм альбумина с заданными свойствами, а также к включению белка в состав разного рода наночастиц [47, 64].
5. Прогнозирование параметров взаимодействия лигандов с альбумином. Накопление знаний о молекулярной структуре альбумина в совокупности с развитием информационных возможностей создает предпосылки для развития технологий прогнозирования с привлечением методов компьютерного моделирования, квантовой химии и др. Методы молекулярной симуляции и моделирования используются для прогнозирования лиганд-белковых взаимодействий и параметров фармакокинетики при разработке новых лекарственных веществ и анализе уже существующих лекарств [36, 43, 63]. В дальнейшем, несомненно, такие подходы будут развиваться [44].
6. Исследование механизма «разгрузки» альбумина в тканях. Исследование этого процесса сопряжено с методическими трудностями, однако понимание механизмов доставки лекарств в ткани является крайне важным, в частности, при создании новых лекарственных препаратов с оптимальными параметрами распределения [65].
7. Анализ транспортной функции альбумина при патологических состояниях. Установлено, что при ряде патологических состояний, связанных с дисфункцией

печени, почек, центральной нервной системы и др., связывающая способность альбумина снижается [3, 9]. Эти данные могут иметь как патофизиологическое, так и фармакологическое значение, позволяя оптимизировать схемы лекарственной терапии.

8. Использование растворов альбумина для детоксикации организма. Предлагается метод экстракорпорального диализа, включающий систему регенерации альбумина, для удаления из организма токсинов, связывающихся альбумином. Полагают, что данный метод будет эффективен при печеночной энцефалопатии, а также для улучшения функции печени и почек [72, 80].

Литература

1. Бендер К.И., Луцевич А.Н. Взаимодействие пипольфена и супрастина с сывороточным альбумином человека в зависимости от рН среды и содержания в ней ионов кальция // Фармакол. токсикол. – 1983. – №6. – С.59-63.
2. Бендер К.И., Луцевич А.Н., Купчиков В.В. Роль конформационных изменений сывороточного альбумина и взаимодействие с ним лекарственных веществ // Фармакол. токсикол. – 1989. – Т.52. – №5. – С.85-95.
3. Грызунов Ю.А., Гринберг А.А., Ступин В.А. и соавт. Информативность показателя «эффективная концентрация альбумина» при распространенном перитоните: данные многоцентрового исследования // Анестезиол. реаниматол. – 2003. – №6. – С.32-35.
4. Миллер Ю.А. Связывание ксенобиотиков альбумином сыворотки крови // Клин. лаб. диагн. – 1993. – №1. – С.34-40.
5. Нямаа Д., Бат-Эрдэнэ О., Бурштейн Э.А. Влияние среды на функциональные и структурные свойства сывороточных альбуминов. I: Влияние ионной силы на сывороточный альбумин человека в N-форме // Мол. биол. – 1984. – №3. – С.839-847.
6. Нямаа Д., Бат-Эрдэнэ О., Бурштейн Э.А. Влияние среды на функциональные и структурные свойства сывороточных альбуминов. II: Влияние температуры на N-форму сывороточного альбумина человека // Мол. биол. – 1984. – №4. – С.972-978.
7. Нямаа Д., Бат-Эрдэнэ О., Бурштейн Э.А. Влияние среды на функциональные и структурные свойства сывороточных альбуминов: III: Зависимость переходов N-F1-, F1-F2- и F2-E- переходов сывороточного альбумина человека от температуры и ионной силы // Мол. биол. – 1985. – №3. – С.833-840.
8. Нямаа Д., Бат-Эрдэнэ О., Бурштейн Э.А. Влияние среды на функциональные и структурные свойства сывороточных альбуминов: IV: Состояние сывороточного альбумина человека в зоне рН от 5 до 10 // Мол. биол. – 1985. – № 6. – С.1679-1684.

9. Смолина Н.В., Грызунов Ю.А., Максимова Н.М. и соавт. Свойства связывающих центров молекулы альбумина у больных тревожной депрессией: исследование методом тушения флюоресценции // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2007. – Т.144. – №11. – С.514-516.
10. Справочник лекарств РЛС. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. http://www.rlsnet.ru/tn_alf.htm
11. Чегёр С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. – Бухарест: Изд-во Академии Соц. Республики Румынии, 1975. – 183 с.
12. Ascenzi P., Bocedi A., Notari S. et al. Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site I // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol.334. – №2. – P.481-486.
13. Ascenzi P., Bocedi A., Notari S. et al. Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin // Mini-Rev. Med. Chem. – 2006. – Vol. 6. – P. 483-489.
14. Ascenzi P., di Masi A., De Sanctis G. et al. Ibuprofen modulates allosterically NO dissociation from ferrous nitrosylated human serum heme-albumin by binding to three sites // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – Vol.387. – №1. – P.83-86.
15. Ascenzi P., Fasano M. Serum heme-albumin: an allosteric protein // IUBMB Life. – 2009. – Vol.61. – №12. – P.1118-1122.
16. Baker M., Parton T. Kinetic determinants of hepatic clearance: Plasma protein binding and hepatic uptake // Xenobiotica – 2007. – Vol. 37. – №10–11. – P.1110–1134.
17. Baroni S., Mattu M., Vannini A. et al. Effect of ibuprofen and warfarin on the allosteric properties of haem-human serum albumin. A spectroscopic study // Eur. J. Biochem. – 2001. – Vol.268. – №23. – P.6214-6220.
18. Bertucci C., Domenici E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance // Curr. Med. Chem. – 2002. – Vol.9. – №15. – P.1463-1481.
- 19.** Bertucci C., Nanni B., Raffaelli A., Salvadori P. Chemical modification of human albumin at cys34 by ethacrynic acid: structural characterisation and binding properties // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – Vol.18. – №1-2. – P.127-136.
20. 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. – Vol.275. – №49. – P.38731-38738.

21. Bhattacharya A.A., Grüne T., Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol.303. – №5. – P.721-732.
22. Bhattacharya M., Jain N., Bhasne K. et al. pH-induced conformational isomerization of bovine serum albumin studied by extrinsic and intrinsic protein fluorescence // J. Fluoresc. – 2010. – DOI 10.1007/s10895-010-0781-3.
23. Bischer A., Zia-Amirhosseini P., Iwaki M. et al. Stereoselective binding properties of naproxen glucuronide diastereomers to proteins // J. Pharmacokinet. Biopharm. – 1995. – Vol.23. – №4. – P.379-395.
24. Boulton D. W., Walle U. K., Walle T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins // J. Pharm. Pharmacol. – 1998. – Vol.50. – №2. – P.243-249.
25. Brée F., Urien S., Nguyen P., Tillement J.P. et al. Human serum albumin conformational changes as induced by tenoxicam and modified by simultaneous diazepam binding // J. Pharm. Pharmacol. – 1993. – Vol.45. – №12. – P.1050-1053.
26. Brodersen R. Bilirubin. Vol. I. Chemistry. / Ed. by Heirwegh K.P.M., Brown S.B. – Florida: CRC Press, Boca Raton. 1982, P.75-123.
27. Buttar D., Colclough N., Gerhardt S. et al. A combined spectroscopic and crystallographic approach to probing drug-human serum albumin interactions // Bioorg. Med. Chem. – 2010. – Vol.18. – №21. – P.7486-7496.
28. [Carter D.C.](#), [Ho J.X.](#) Structure of serum albumin // [Adv. Protein Chem.](#) – 1994. – Vol.45. – P.153-203.
29. Chen Y.M., Guo L.H. Combined fluorescence and electrochemical investigation on the binding interaction between organic acid and human serum albumin // J. Environ. Sci. (China). – 2009. – Vol.21, №3. – P.373-379.
30. Choi J.K., Ho J., Curry S. et al. Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin // J. Lipid Res. 2002. Vol. 43. P.1000-1010.
31. Chuang V.T., Kuniyasu A., Nakayama H. et al. Helix 6 of subdomain III A of human serum albumin is the region primarily photolabeled by ketoprofen, an arylpropionic acid NSAID containing a benzophenone moiety // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol.1434. – №1. – P.18-30.
32. Chuang V.T., Otagiri M. How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin? // Pharm. Res. – 2002. – Vol.19. – №10. – P.1458-1464.
33. Colmenarejro G. *In silico* prediction of drug-binding strengths to human serum albumin // Med. Res. Rev. – 2003. – Vol.23. – №3. – P.275-301.

34. Curry S. Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2009. – Vol.24. – №4. – P.342-357.
35. Curry S., Brick P., Franks N.P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol.1441. – №2-3. – P.131-140.
36. Deeb O., Rosales-Hernández M.C., Gómez-Castro C. et al. Exploration of human serum albumin binding sites by docking and molecular dynamics flexible ligand-protein interactions // *Biopolimers.* – 2010. – Vol.93. – №2. – P.161-170.
37. DrugBank database. <http://www.drugbank.ca>
38. Fanali G., Pariani G., Ascenzi P., Fasano M. Allosteric and binding properties of Asp1-Glu382 truncated recombinant human serum albumin--an optical and NMR spectroscopic investigation // *FEBS J.* – 2009. – Vol.276. – №8. – P.2241-2250.
- 39.** Fehske K.J., Müller W.E., Wollert U. The location of drug binding sites in human serum albumin // *Biochem. Pharmacol.* – 1981. – Vol.30. – №7. – P.687-692.
40. [Fehske K.J.](#), [Schlafer U.](#), [Wollert U.](#), [Müller W.E.](#) Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone // *Mol. Pharmacol.* – 1982. – Vol.21. – №2. – P.387-393.
41. Fujiwara S., Amisaki T. Molecular dynamics study of conformational changes in human serum albumin by binding of fatty acids // *Proteins.* – 2006. – Vol.64. – №3. – P.730-739.
42. Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin // *J. Mol. Biol.* – 2005. – Vol.353. – №1. – P.38-52.
43. Gleeson M.P., Hersey A., Hannongbua S. In-silico ADME models: a general assessment of their utility in drug discovery applications // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2011. – Vol.11. – №4. – P.358-381.
44. Gustafsson S.S., Vrang L., Terelius Y., Danielson U.H. Quantification of interactions between drug leads and serum proteins by use of "binding efficiency" // *Anal. Biochem.* – 2011. – Vol.409. – №2. – P.163-175.
45. Hamilton J. A. Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us // *Prog. Lipid. Res.* – 2004. – Vol.43. – №3. – P.177-199.
46. [Harmsen B.J.](#), [De Bruin S.H.](#), [Janssen L.H.](#) et al. pK change of imidazole groups in bovine serum albumin due to the conformational change at neutral pH // *Biochem.* – 1971. – Vol.10. – №7. – P.3217-3221.
47. Hawkins M.J., Soon-Shiong P., Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol.60. – №8. – P.876-885.

48. Hein K.L., Kragh-Hansen U., Morth J.P. et al. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin // *J. Struct. Biol.* – 2010. – Vol.171. – №3. – P.353-360.
49. Horie T., Mizuma T., Kasai S., Awazu S. Conformational changes in plasma albumin due to interaction with isolated rat hepatocytes // *Am. J. Physiol.* – 1988. – Vol. 254. – №4. (Pt 1). G.465-G470.
50. Irikura M., Takadate A., Goya S., Otagiri M. 7-Alkylaminocoumarin-4-acetic acids as fluorescent probe for studies of drug-binding sites on human serum albumin // *Chem. Pharm. Bull.* – 1991. – Vol.39. – №3. – P.724-728.
51. [Janssen L.H.](#), [Van Wilgenburg M.T.](#), [Wilting J.](#) Human serum albumin as an allosteric two-state protein: Evidence from effects of calcium and warfarin on proton binding behaviour // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1981. – Vol.669. – №2. – P.244-250.
52. Joseph K.S., Moser A.C., Basiaga S.B. et al. Evaluation of alternatives to warfarin as probes for Sudlow site I of human serum albumin: characterization by high-performance affinity chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol.1216. – №16. – P.3492-3500.
53. Joshi P., Chakraborty S., Dey S. et al. Binding of chloroquine-conjugated gold nanoparticles with bovine serum albumin // *J. Colloid Interface Sci.* – 2011. – Vol.355. – №2. – P.402-409.
54. Kamal J.K.A., Zhao L., Zewail A.H. Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: Human serum albumin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol.101. – №37. – P.13411-13416.
55. Kandagal P.B., Ashoka S., Seetharamappa J. et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – Vol.41. – №2. – P.393-399.
56. Kim H.S., Hage D.S. Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2005. – Vol.816. – №1-2. – P.57-66.
57. [Kragh-Hansen U.](#) Molecular aspects of ligand binding to serum albumin // *Pharmacol. Rev.* – 1981. – Vol.33. – №1. – P.17-53.
58. Kragh-Hansen U. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin // *Biochem. J.* – 1985. – Vol.225. – №3. – P.629-638.
59. Kragh-Hansen U. Evidence for a large and flexible region of human serum albumin possessing high affinity binding sites for salicylate, warfarin, and other ligands // *Mol. Pharmacol.* – 1988. – Vol.34. – №2. – P.160-171.

60. Kragh-Hansen U. Octanoate binding to the indole- and benzodiazepine-binding region of human serum albumin // *Biochem. J.* – 1991. – Vol.273. – Pt.3. – P.641-644.
61. Kragh-Hansen U., Chuang V.T.G., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin // *Biol. Pharm. Bull.* – 2002. – Vol.25. – №6. – P.695-704.
62. Kragh-Hansen U., Minchiotti L., Brennan S.O., Sugita O. Hormone binding to natural mutants of human serum albumin // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – Vol.193. – №1. – P.169-174.
63. Kratochwil N.A., Huber W., Müller F. et al. Predicting plasma protein binding of drugs: A new approach // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – Vol.64. – №9. – P.1355-1374.
64. Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles // *J. Control Release.* – 2008. – Vol.132. – №3. – P.171-183.
65. Liu X., Chen C., Hop C.E. Do we need to optimize plasma protein and tissue binding in drug discovery? // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2011. – Vol.11. – №4. – P.450-466.
66. Liu X., Smith B.J., Chen C. et al. Use of physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach brain equilibrium: An experimental analysis of the role of blood-brain barrier permibility, plasma protein binding, and brain tissue binding // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol.313. – №3. – P.1254-1262.
67. Lu J., Stewart A.J., Sadler P.J. et al. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol.36. – Pt. 6. – P.1317-1321.
68. Mallik R., Yoo M.J., Chen S., Hage D.S. Studies of verapamil binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2008. – Vol.876. – №1. – P.69-75.
69. Matsushita Y., Gouda H., Tsujishita H., Hirono S. Determination of binding conformations of drugs to human serum albumin by transferred nuclear overhauser effect measurements and conformational analyses using high-temperature molecular dynamics calculations // *J. Pharm. Sci.* – 1998. – Vol.87. – №3. – P.379-386.
70. Meisner H., Neet K. Competitive binding of long-chain free fatty acids, octanoate, and chlorophenoxyisobutyrate to albumin // *Mol. Pharmacol.* – 1978. – Vol.14. – №2. – P.337-346.
71. Mignot I., Presle N., Lapicque F. et al. Albumin binding sites for etodolac enantiomers // *Chirality.* – 1996. – Vol.8, №3. – P.271-280.
72. Mitzner S.R., Stange J., Klammt S. et al. Albumin dialysis MARS: knowledge from 10 years of clinical investigation // *ASAIO J.* – 2009. – Vol.55. – №5. – P.498-502.

73. Montero M. T., Pouplana R., Valls O., Garcia S. On the binding of cinmetacin and indomethacin to human serum albumin // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1986. – Vol.38. – №12. – P.925-927.
74. Mudge G. H., Desbiens N., Stibitz G. R. Binding of iophenoxate and iopanoate to human serum albumin // *Drug Metab. Dispos.* – 1978. – Vol.6. – №4. – P.432-439.
75. Nerli B., Romanini D., Picó G. Structural specificity requirements in the binding of beta lactam antibiotics to human serum albumin // *Chem. Biol. Interact.* – 1997. – Vol.104. – №2-3. – P.179-202.
76. Neumann E., Frei E., Funk D. et al. Native albumin for targeted drug delivery // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2010. – Vol.7. – №8. – P.915-925.
77. Nicoletti F.P., Howes B.D., Fittipaldi M. et al. Ibuprofen induces an allosteric conformational transition in the heme complex of human serum albumin with significant effects on heme ligation // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol.130. – №35. – P.11677-11688.
78. Nikolić N., Vranjes-Ethurić S., Janković D. et al. Preparation and biodistribution of radiolabeled fullerene C₆₀ nanocrystals // *Nanotechnology.* – 2009. – Vol.20. – №38. – P.385102.
79. Noskov B.A., Mikhailovskaya A.A., Lin S.Y. et al. Bovine serum albumin unfolding at the air/water interface as studied by dilational surface rheology // *Langmuir.* – 2010. – Vol.26. – №22. – P.17225-17231.
80. Novelli G., Rossi M., Pretagostini R. et al. A 3-year experience with Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS): our results on 63 patients with hepatic failure and color Doppler US evaluation of cerebral perfusion // *Liver Int.* – 2003. – Vol.23. – Suppl. 3. – P.10-15.
81. Otagiri M., Masuda K., Imai T. et al. Binding of pirofen to human serum albumin studied by dialysis and spectroscopy techniques // *Biochem. Pharmacol.* – 1989. – Vol.38. – №1. – P.1-7.
82. Otagiri M., Nakamura H., Maruyama T. et al. Characterization of binding sites for sulfadimethoxine and its major metabolite, N4-acetylsulfadimethoxine, on human and rabbit serum albumin // *Chem. Pharm. Bull.* – 1989. – Vol.37. – №2 – P.498-501.
83. [Panjehshahin M.R.](#), [Bowmer C.J.](#), [Yates M.S.](#) Effect of valproic acid, its unsaturated metabolites and some structurally related fatty acids on the binding of warfarin and dansylsarcosine to human albumin // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – Vol.41. – №8. – P.1227-1233.

84. Peters T., Jr. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. – San Diego: Academic Press. 1996. 432 p.
85. [Petersen C.E.](#), [Ha C.E.](#), [Harohalli K.](#) et al. A dynamic model for bilirubin binding to human serum albumin // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol.275. – №28. – P.20985-20995.
86. [Petersen C.E.](#), [Ha C.E.](#), Jameson D.M., Bhagavan N.V. Mutations in a specific human serum albumin thyroxine binding site define the structural basis of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol.271. – №32. – P.19110-19117.
87. Petitpas I., Bhattacharya A. A., Twine S. et al. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol.276. – №25. – P.22804-22809.
88. 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. – Vol.314. – №5. – P.955-960.
89. Petitpas I., Petersen C.E., Ha C.E. et al. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2003. – Vol.100. – №11. – P.6440-6445.
90. Petrelli F., Bogonovo K., Barni S. Targeted delivery for breast cancer therapy: the history of nanoparticle-albumin-bound paclitaxel // Expert Opin. Pharmacother. – 2010. – Vol.11. – №8. – P.1413-1432.
91. Protein Data Bank. A Resource for Studying Biological Macromolecules. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
92. Rahman M.H., Maruyama T., Okada T. et al. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin. – I. Mechanism of binding studied by dialysis and spectroscopic methods // Biochem. Pharmacol. – 1993. – Vol.46. – № 10. – P.1721-1731.
93. Rahman M.H., Maruyama T., Okada T. et al. 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. – Vol.46. – №10. – P.1733-1740.
94. Rahman M. H., Yamasaki K., Shin Y. H. et al. Characterization of high affinity binding sites of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to site-specific probes on human serum albumin // Biol. Pharm. Bull. – 1993. – Vol.16. – №11. – P.1169-1174.
95. Ryan A.J., Ghuman J., Zunszain P.A. et al. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin // J. Struct. Biol. – 2011. – Vol.174. – №1. – P.84-91.

96. Sakai T., Takadate A., Otagiri M. Characterization of binding site of uremic toxins on human serum albumin // *Biol. Pharm. Bull.* – 1995. – Vol.18. – №12. – P.1755-1761.
97. Simard J.R., Zunszain P.A., Hamilton J.A., 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. – Vol.361. – №2. – P.336-351.
98. Stepensky D. Use of unbound volumes of drug distribution in pharmacokinetic calculations // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol. 42. – №1-2. – P.91-98.
99. [Sudlow G.](#), [Birkett D.J.](#), [Wade D.N.](#) Spectroscopic techniques in the study of protein binding: A fluorescence technique for the evaluation of the albumin binding and displacement of warfarin and warfarin-alcohol // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1975. – Vol.2. – №2. – P.129-140.
100. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution // *Protein Eng.* – 1999. – Vol.12. – №6. – P.439-446.
101. Takamura N., Haruta A., Kodama H. et al. Mode of interaction of loop diuretics with human serum albumin and characterization of binding site // *Pharm. Res.* – 1996. – Vol.13. – №7. – P.1015-1019.
102. Takamura N., Maruyama T., Ahmed S. et al. Interactions of aldosterone antagonist diuretics with human serum proteins // *Pharm. Res.* – 1997. – Vol.14. – №4. – P.522-526.
103. Takamura N., Rahman M. H., Yamasaki K. et al. Interaction of benzothiadiazides with human serum albumin studied by dialysis and spectroscopic methods // *Pharm. Res.* – 1994. – Vol.11. – №10. – P.1452-1457.
104. Takamura N., Shinozawa S., Maruyama T. et al. Effects of fatty acids on serum binding between furosemide and valproic acid // *Biol. Pharm. Bull.* – 1998. – Vol.21. – №2. – P.174-176.
105. Tanaka H., Mizojiri K. Drug-protein binding and blood-brain barrier permeability // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1999. – Vol.288. – №3. – P.912-918.
106. Tsutsumi Y., Maruyama T., Takadate A. et al. Interaction between two dicarboxylate endogenous substances, bilirubin and an uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, on human serum albumin // *Pharm Res.* – 1999. – Vol.16. – №6. – P.916-923.
107. Twine S.M., Lee A.G., Gore M.G. et al. Characterisation of domain fragments of recombinant human albumin // *Biochem. Soc. Trans.* – 1998. – Vol.26. – №3. – S.279.

108. Valkó K.L., Nunhuck S.B., Hill A.P. Estimating unbound volume of distribution and tissue binding by in vitro HPLC-based human serum albumin and immobilised artificial membrane-binding measurements // *J. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol.100. – №3. – P.849-862.
- 109.** Vallner J.J. Binding of drugs by albumin and plasma protein // *J. Pharm. Sci.* – 1977. – Vol.66. – №4. – P.447-465.
110. Van der Vusse G.J. Albumin as fatty acid transporter // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2009. – Vol.24. – №4. – P.300-307.
111. Varshney A., Rehan M., Subbarao N. et al. Elimination of endogenous toxin, creatinine from blood plasma depends on albumin conformation: site specific uremic toxicity & impaired drug binding // *PLoS One.* – 2011. – Vol.6. – №2. – e17230.
112. Varshney A., Sen P., Ahmad E. et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? // *Chirality.* – 2010. – Vol.22. – №1. – P.77-87.
113. Watanabe H., Kragh-Hansen U., Tanase S. et al. Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants // *Biochem. J.* – 2001. – Vol.357. – №1. – P.269-274.
114. Watanabe H., Tanase S., Nakajou K. et al. Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity // *Biochem. J.* – 2000. – Vol.349. – №3. – P.813-819.
115. 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.* – 1996. – Vol.1295. – №2. – P.147-157.
116. Yamasaki K., Maruyama T., Takadate A. et al. Characterization of site I of human serum albumin using spectroscopic analyses: locational relations between regions Ib and Ic of site I // *J. Pharm. Sci.* – 2004. – Vol.93. – №12. – P.3004-3012.
- 117.** Yamasaki K., Rahman M. H., Tsutsumi Y. et al. Circular dichroism simulation shows a site-II-to-site-I displacement of human serum albumin-bound diclofenac by ibuprofen // *AAPS PharmSciTech.* – 2000. – Vol.14. – №1. – E12 (<http://www.pharmscitech.com>).
118. Yoo M.J., Smith Q.R., Hage D.S. Studies of imipramine binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2009. – Vol.877. – №11-12. – P.1149-1154.
- 119.** Zatón A., Martinez A., de Gandarias J. M. The binding of thioureylenes compounds to human serum albumin // *Biochem. Pharmacol.* – 1988. – Vol.37. – №16. – P.3127-3131.

120. Zhao X., Liu R., Chi Z. et al. New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: comprehensive spectroscopic studies // J. Phys. Chem. B. – 2010. – Vol.114. – №16. – P.5625-5631.
121. Zhu L., Yang F., Chen L. et al. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography // J. Struct. Biol. – 2008. – Vol.162. – №1. – P.40-49.
122. [Zurawski V.R. Jr.](#), [Foster J.F.](#) The neutral transition and the environment of the sulfhydryl side chain of bovine plasma albumin // Biochem. – 1974. – Vol.13. – №17. – P.465-471.