ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย): การวิเคราะห์พลังงานของอันตรกิริยาระหว่างอัลบูมินในซีรั่มของมนุษย์ (human serum albumin) และ ตัวยา

(ภาษาอังกฤษ): Calorimetric analysis of human serum albumin-drug Interactions

นักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด: รองศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง [ผู้วิจัยหลัก]
ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มี 2 ส่วนตามวัตถุประสงค์ ได้แก่ 1) เพื่อศึกษาความคงตัวของอัลบูมิจากซีรั่มของมนุษย์ และ 2) เพื่อศึกษาผลของความร้อนต่ออันตรกิริยาระหว่างอัลบูมินกับยาซึ่งทำให้สามารถประเมิน dissociation parameter ได้ ทำการสกัด stabilizer additives ที่ติดมากับเภสัชผลิตภัณฑ์อัลบูมินด้วยถ่านกำมันต์ แล้วเตรียมสารละลายอัลบูมินใน pH 7.4 บับเฟอร์ เติม sodium caprylate (stabilizer additive), diazepam, หรือ ibuprofen แบบอนุกรมความเข้มข้นต่างๆ จากนั้น นำตัวอย่างเหล่านี้ตลอดจนเภสัชผลิตภัณฑ์อัลบูมินที่เติมและไม่เติม diazepam ซีรั่มของมนุษย์ และ enriched-albumin fraction มาทดสอบด้วย differential scanning calorimetry ในช่วงอุณหภูมิ 37-90 $^{\circ}$C อัตราการสแกน ที่ 3.0 และ 5.0°C/min อัลบูมินที่เติม sodium caprylate และ เภสัชผลิตภัณฑ์อัลบูมินสลายตัว ณ อุณหภูมิสูงกว่าอัลบูมินอย่างมีนัยสำคัญ จากการวัดขนาดอนุภาคนาโนอัลบูมินแขวนลอยในสารละลายโดยเครื่อง dynamic light scattering พบว่า อัลบูมินที่สกัด additives แล้ว ไม่คงตัวเท่าอัลบูมินในรูป native ด้วยพบการเกาะกลุ่มของอนุภาค Caprylate ion อาจลดการเกาะกลุ่มดังกล่าวโดยไปเพิ่ม electrical double layer ที่ล้อมรอบอนุภาค เมื่อใช้แบบจำลอง Lumry-Eyring สำหรับการสลายตัวของอัลบูมินด้วยความร้อน โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ caprylate จาก 0 ถึง~0.08 mmole /g การสลายตัวของอัลบูมินเปลี่ยนแปลงจาก irreversible dominant Scheme; $N \xrightarrow{k_3 K} P$ ไปเป็น reversible dominant Scheme; $N \xrightarrow{k_1} P$ ในขณะที่การสลายตัวของอัลบูมินเมื่อเติม diazepam และ ibuprofen ยังคงเป็น irreversible dominant Scheme ดั่งเดิม จึงตั้งสมมติฐานว่า caprylate อาจไปลดอัตราการคลายตัวของโปรตีนในขั้นตอนแรกของการสลายตัว ทำให้ขั้นตอนต่อเนื่องของการสลายตัวเกิดได้ยากขึ้นจึงเพิ่มความคงตัวของอัลบูมินได้ ส่วนอันตรกิริยาระหว่างอัลบูมินกับยาที่ทดสอบ ทำให้อัลบูมินสลายตัวที่อุณหภูมิสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยเนื่องจากการปรับสมดุลผ่านสารเชิงซ้อน [โปรตีน-ยา] อย่างไรก็ตาม diazepam สามารถลดอุณหภูมิการสลายตัวของเภสัชภัณฑ์อัลบูมินลงได้อย่างชัดเจน จึงมีสมมติฐานว่า diazepam ไปแย่งจับกับโปรตีนได้สารเชิงซ้อน [โปรตีน-diazepam] และ [โปรตีน-caprylate] (additive ที่มีอยู่แล้ว) ซึ่งสลายตัวด้วยกลไกต่างกัน ได้แก่ irreversible และ reversible dominant schemes ตามลำดับ เมื่อประยุกต์แบบจำลอง Lumry-Eyring เพื่อตรวจสอบผลของอันตรกิริยาระหว่างอัลบูมินกับยาต่อการสลายตัวของอัลบูมินด้วยความร้อน ทำให้สามารถหา dissociation parameters ของระหว่างอัลบูมินกับ diazepam และ ibuprofen ซึ่งทั้งคู่เป็นยาที่จับกับอัลบูมิน ณ บริเวณปฐมภูมิบริเวณเดี่ยว ค่าที่ได้สอดคล้องใกล้เคียงกันกับ equilibrium dissociation constants ของยาเดียวกันโดยวิธีอื่น

Abstract

This research project includes 2 parts with the objectives of: 1) to study how the additives stabilize the commercial human serum albumin (HSA) product and 2) to assess the thermal energetics of protein denaturation that could lead to the determination of its equilibrium dissociation parameter. Commercial HSA was treated with activated charcoal to remove additives and dissolved in pH 7.4 buffered solutions. Serial concentrations of sodium caprylate, diazepam, or ibuprofen were added to the solutions. These samples as well as commercial albumin products with and without the addition of diazepam, and enriched-albumin fraction were individually subjected to differential scanning calorimetry running between 37 and 90°C with 3.0 and 5.0 scanning rates. Capryate-doped HSA and commercial product denatured at temperature significantly higher than albumin did. The globular nano-size of albumin was measured by dynamic light scattering. It was found that the globules of additives-removal HSA were not as stable as those of the native one owing to aggregation, and the caprylate ion may lower the aggregation by increasing electrical double layer. With the utilization of Lumry-Eyring protein denaturation model, it was found that HSA denaturation changed from the irreversible dominant scheme; $N \xrightarrow{k_3 K} P$ to the reversible dominant scheme; $N \xrightarrow{k_1} P$ with the increase in caprylate level from 0 to ~0.08 mmole/g-protein. But the scheme remained the same in cases of adding diazepam and ibuprofen. It was then hypothesize that caprylate may decrease the rate of initial reversible unfolding step which causes difficulty for further irreversible denaturation step. By this means, HSA can be stabilized. The interaction between HSA and the drug under study caused the denaturation temperature to slightly increase. It is because the equilibrium of the system was shifted towards the native protein bound to the drug. Nevertheless, addition of diazepam could marhedly reduce the denaturation temperature of commercial HSA. It was thus postulated that diazepam may compete with caprylate which already present in the commercial HSA product yielding [HSA-diazepam] and [HSA-caprylate] type complexes which denatured via irreversible and reversible dominant schemes, respectively. The differential scanning calorimetric data were successfully treated with Lumry-Eyring model. It was used to assess the dissociation parameters for HSA-diazepam and HSA-ibuprofen where both drugs bind at a single high-affinity primary binding site on the protein. The results were comparable to those obtained from other methods.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยประเภททั่วไป ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรมและสถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา คณะเภสัชศาสตร์ ในการอนุเคราะห์เครื่องมือวิจัย นายจตุรวิทย์ คงประเสริฐกิจ อดีตนักศึกษาปริญญาเอกสาขาเภสัชศาสตร์ ในการช่วยวิจัย และ องค์การเภสัชกรรม ที่อนุเคราะห์วัตถุออกฤทธิ์ประเภท 3 ทำให้งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์ได้