

MEKANISME INTERAKSI SEBATIAN PSIKOAKTIF  
DARIPADA *Mitragyna speciosa* DENGAN ALBUMIN  
SERUM MANUSIA DAN GLIKOPROTEIN ASID- $\alpha_1$ :  
PENDEKATAN BIOFIZIK DAN PEMODELAN  
MOLEKUL

KHAIRUL AZREENA BINTI BAKAR

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

MEKANISME INTERAKSI SEBATIAN PSIKOAKTIF DARIPADA *Mitragyna speciosa* DENGAN ALBUMIN SERUM MANUSIA DAN GLIKOPROTEIN ASID- $\alpha_1$ :  
PENDEKATAN BIOFIZIK DAN PEMODELAN MOLEKUL

KHAIRUL AZREENA BINTI BAKAR

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH  
DOKTOR FALSAFAH

FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
BANGI

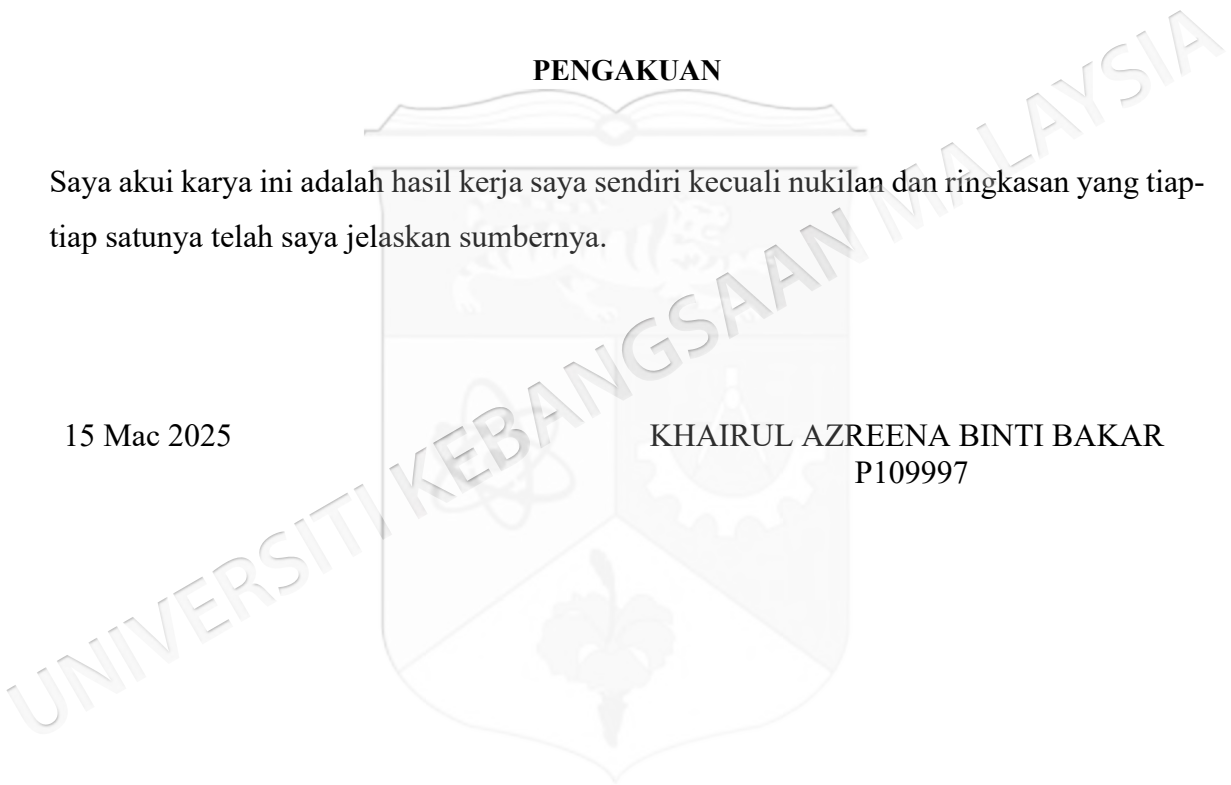
2025

**PENGAKUAN**

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

15 Mac 2025

**KHAIRUL AZREENA BINTI BAKAR**  
P109997

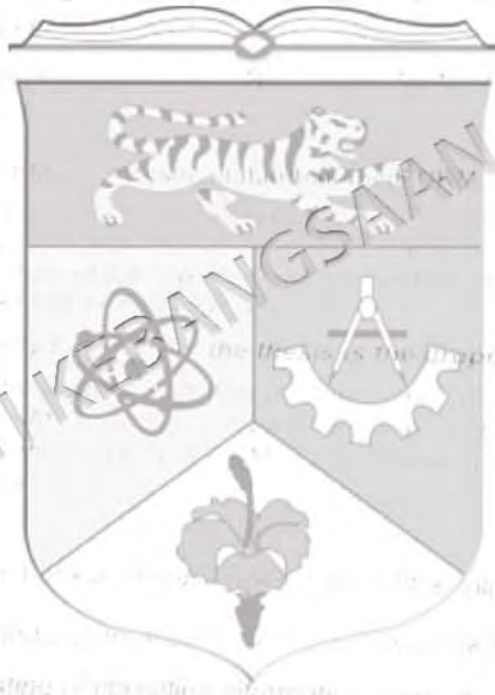


PERAKUAN TESIS SARJANA / DOKTOR FALSAFAH  
(DECLARATION OF MASTER / DOCTOR OF PHILOSOPHY THESIS)

A. MAKLUMAT PELAJAR / STUDENT DETAILS

Name: ...  
No. Pendaftaran: ...  
Kategori: ...  
Kod: ...  
Matrik: ...  
No. ...

B. PERAKUAN / DECLARATION



RAI'AN  
CONFIDENTIAL

TERHAD  
RESTRICTED

Merupakan ...  
Consisting of ...  
Consisting of RESTRICTED information which has been obtained by the organisation/body, where the research was carried out.



## PENGHARGAAN

Alhamdulillah, segala puji dan syukur saya tadahkan tangan kepada Allah S.W.T. atas segala anugerah kurniaan-Nya termasuklah tubuh badan yang cergas, masa yang produktif dan akal fikiran cerdas sepanjang penyelidikan dan penulisan ilmiah ini dijalankan. Dengan penuh rasa hormat dan terima kasih, saya abadikan sekalung penghargaan atas keseluruhan pengorbanan kepada penyelia utama iaitu iaitu Dr. Shevin Rizal Feroz. Beliau telah memainkan peranan besar sebagai penasihat yang penuh dedikasi dan telah banyak membantu saya menempuhi cabaran dalam bidang penyelidikan ini. Sanjungan terima kasih juga saya ingin sampaikan kepada penyelia bersama iaitu Dr. Lam Su Datt yang berperanan penting dalam memberi bimbingan tak ternilai untuk memastikan kelancaran penyelidikan ini. Tidak lupa juga kepada penyelidik bersama yang terlibat secara langsung dalam penyelidikan saya, iaitu Dr. Low Chen Fei, atas tunjuk ajar dan khidmat nasihat yang berharga sepanjang proses penyelidikan ini.

Terima kasih juga diucapkan kepada Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia untuk kemudahan makmal lengkap dan berfungsi baik yang disediakan untuk menjalankan penyelidikan ini. Jutaan penghargaan dan terima kasih juga diberikan kepada Kementerian Pendidikan Malaysia atas inisiatif dana penyelidikan (FRGS/1/2019/STG04/UKM/02/6) bagi membiayai projek penyelidikan ini. Terima kasih kepada MARA kerana menaja pengajian saya di UKM melalui program graduan cemerlang. Seterusnya, saya ingin mengucapkan terima kasih atas perkhidmatan cemerlang yang diberikan oleh Puan Azzyati Mohd Padzil, Puan Azney Zuhaily Md. Taib dari Institut Genom dan Vaksin Malaysia, serta Puan Norhaya Abdul Rahim dari Universiti Malaya semasa menjalankan kerja penyelidikan.

Saya juga merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada pendorong utama sepanjang pengajian ini iaitu, Encik Bakar Latip dan Puan Habibah Obeng, ibubapa yang sentiasa memberikan sokongan moral, sumber kewangan dan doa yang tidak putus-putus untuk kejayaan anakanda tercinta mereka. Jutaan terima kasih kepada adik-beradik saya yang telah banyak memberikan sokongan moral dan galakan kepada saya untuk menghabiskan pengajian saya. Tidak terlambat juga saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan-rakan sepengajian, terutamanya Cik Ng Yan Hong, Encik Mujaheed Abubakar, Encik Ahmad Fadhlurrahman Ahmad Hidayat, Cik Nurul Jannah Mohd Asngari, Cik Siti Aishah Hadawiah Ahmad dan Cik Zainab Saberi yang banyak memberikan bantuan dan nasihat yang bermanfaat sehingga saya dapat menyiapkan projek kajian saya.

Secara keseluruhan, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang memberikan nasihat dan bantuan, sama ada secara langsung atau tidak, sepanjang perjuangan saya sebagai mahasiswa di UKM.

## ABSTRAK

*Mitragyna speciosa* (lazimnya dikenali sebagai ketum) adalah tumbuhan psikoaktif yang daunnya digunakan secara tradisional sebagai pelega kesakitan dan agen perangsang. Alkaloid indol utama ketum, mitraginin (MTG) dan terbitannya, 7-hidroksimitraginin (7-OH-MTG), bertanggungjawab terhadap kesan analgesik tumbuhan ini yang diperantara oleh reseptor opioid. Efikasi dan sifat farmakokinetik sebatian fitokimia ini adalah berkaitan dengan interaksinya dengan protein plasma, terutamanya albumin serum manusia (HSA) dan glikoprotein asid- $\alpha_1$  (AAG). Sehingga kini, hanya terdapat kajian MTG dan 7-OH-MTG dengan keseluruhan protein plasma yang telah dilakukan, namun tiada kajian spesifik terhadap HSA dan AAG. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk mencirikan secara komprehensif profil pengikatan MTG dengan HSA dan AAG menggunakan kedua-dua pendekatan eksperimen (kalorimetri, spektroskopi dan mikroskopi) dan pengkomputeran (simulasi dok dan dinamik molekul). Manakala, profil pengikatan 7-OH-MTG dengan HSA dan AAG hanya dikaji menggunakan pendekatan pengkomputeran. Analisis *in silico* ADMET mencadangkan MTG dan 7-OH-MTG sebagai calon dadah psikoaktif yang berpotensi dengan ketoksikan dan profil farmakokinetik yang baik. Analisis data pendarfluor dan kalorimetri pentitratan isoterma menunjukkan afiniti pengikatan yang sederhana bagi kompleks protein-MTG (pemalar asosiasi ( $K_a$ ) =  $10^3$ – $10^5$  M<sup>-1</sup>), dengan interaksi yang lebih kuat antara MTG dan AAG berbanding dengan HSA. Data dikroisme membulat dan pendarfluor 3D menunjukkan bahawa pengikatan MTG mempunyai kesan yang minimum terhadap integriti struktur kedua-dua protein. Ini disokong oleh perubahan dalam spektrum penyerapan UV bagi HSA dan AAG setelah pentitratan MTG; serta dimensi protein yang diperhatikan menggunakan mikroskopi daya atom. Hasil eksperimen sesaran dadah kompetitif dan simulasi dok molekul adalah konsisten, yang menunjukkan bahawa tapak III HSA (pada subdomain IB) adalah tapak pengikatan utama bagi MTG. Hasil simulasi dok menunjukkan bahawa 7-OH-MTG juga mengikat pada tapak yang sama tetapi dengan tenaga pengikatan lebih rendah berbanding MTG. Bagi AAG, kedua-dua sebatian mengedok pada saku pengikatan hidrofobik pusat bagi kedua-dua varian F1\*S dan A dengan perbezaan minor dalam orientasi pengikatan. Penglibatan interaksi hidrofobik (alkil, pi-alkil, pi-pi), ikatan hidrogen dan daya van der Waals dicadangkan dalam penstabilan kompleks protein-ligan. Simulasi dinamik molekul menyokong kestabilan protein apabila berkompleks dengan MTG dan 7-OH-MTG. Hasil daripada kajian ini adalah penting dalam pembangunan sebatian-sebatian terbitan ketum sebagai agen terapeutik.

**INTERACTION MECHANISM OF PSYCHOACTIVE COMPOUNDS FROM *Mitragyna speciosa* WITH HUMAN SERUM ALBUMIN AND  $\alpha_1$ -ACID GLYCOPROTEIN: BIOPHYSICAL AND MOLECULAR MODELING APPROACHES**

**ABSTRACT**

*Mitragyna speciosa* (commonly known as kratom) is a psychoactive plant whose leaves are traditionally used for pain relief and as a stimulant. The main indole alkaloids in kratom, mitragynine (MTG), and its derivative, 7-hydroxymitragynine (7-OH-MTG), are responsible for the analgesic effects of the plant which are mediated by opioid receptors. The efficacy and pharmacokinetic profile of these phytochemicals are associated with their interactions with plasma proteins, particularly human serum albumin (HSA) and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AAG). Until now, studies on MTG and 7-OH-MTG have only been conducted with total plasma proteins, but no specific studies have been carried out on HSA and AAG. Therefore, this study aims to comprehensively characterize the binding profiles of MTG with HSA and AAG using both experimental (calorimetric, spectroscopic, and microscopic) and computational approaches (docking and molecular dynamics simulations). Meanwhile, the binding profile of 7-OH-MTG with HSA and AAG will be studied solely using computational approaches. *In silico* ADMET analysis suggests MTG and 7-OH-MTG as potential psychoactive drug candidates with favorable toxicity and pharmacokinetic profiles. Analysis of fluorescence and isothermal titration calorimetric data revealed intermediate binding affinity for the protein–MTG complexes (association constant ( $K_a$ ) =  $10^3$ – $10^5$  M<sup>-1</sup>), with stronger interaction between MTG and AAG compared to HSA. Circular dichroism and 3D fluorescence data showed that MTG binding had minimal effect on the structural integrity of both proteins. This is supported by changes in the UV absorption spectra of HSA and AAG upon MTG titration, as well as the dimensions of the proteins as observed using atomic force microscopy. Results of competitive drug displacement experiments and molecular docking simulations were consistent, indicating that site III of HSA (in subdomain IB) is the primary binding site for MTG. Docking simulation results indicate that 7-OH-MTG also binds to the same site but with a lower binding energy than MTG. For AAG, both compounds were docked to the central hydrophobic binding pocket of both F1\*S and A variants with minor differences in binding orientation. Involvement of hydrophobic interactions (alkyl, pi–alkyl, pi–pi), hydrogen bonding, and van der Waals forces are suggested in the stabilization of the ligand–protein complexes. Molecular dynamics simulations supported the stability of the proteins upon complexation with MTG and 7-OH-MTG. The outcomes of this study are significant in the development of kratom-derived compounds as therapeutic agents.

## KANDUNGAN

	<b>Halaman</b>
<b>PENGAKUAN</b>	III
<b>PENGHARGAAN</b>	IV
<b>ABSTRAK</b>	V
<b>ABSTRACT</b>	VI
<b>KANDUNGAN</b>	VII
<b>SENARAI JADUAL</b>	XI
<b>SENARAI ILUSTRASI</b>	XIII
<b>SENARAI SINGKATAN</b>	XVIII

<b>BAB I</b>	<b>PENDAHULUAN</b>	
1.1	Pengenalan	1
1.2	Pernyataan Masalah	4
1.3	Hipotesis Kajian	6
1.4	Objektif Kajian	7
1.5	Rasional Kajian	8
<b>BAB II</b>	<b>ULASAN KEPUSTAKAAN</b>	
2.1	<i>Mitragyna speciosa</i> (KORTH.)	10
	2.1.1 Morfologi dan habitat tumbuhan ketum	12
	2.1.2 Penggunaan ketum dalam bidang perubatan	13
	2.1.3 Sebatian-sebatian alkaloid ketum	18
2.2	Mitraginin	20
	2.2.1 Sifat farmakologi MTG	21
	2.2.2 Profil farmakokinetik MTG	23
2.3	7-Hidroksimitraginin	27

2.3.1	Sifat farmakologi 7-OH-MTG	28
2.3.2	Profil farmakokinetik 7-OH-MTG	30
2.4	Pengikatan Ligan Terapeutik dengan Protein Plasma di dalam Sistem Peredaran Manusia	32
2.4.1	Mekanisme interaksi dengan protein plasma	33
2.4.2	Kaedah-kaedah penentuan pengikatan protein–ligan	35
2.5	Albumin Serum Manusia	39
2.5.1	Struktur HSA	39
2.5.2	Peranan dan kepelbagaian fungsi protein HSA	
2.5.3	Tapak-tapak pengikatan HSA	47
2.6	Glikoprotein Asid- $\alpha_1$	55
2.6.1	Struktur varian polimorfik AAG	55
2.6.2	Fungsi biologi dan peranan patalogi AAG	59
2.6.3	Pengikatan dadah pada AAG	62
2.7	Implikasi dan Aplikasi Klinikal Berkaitan Pengikatan Protein Plasma	66
2.7.1	Eksplorasi penyesaran dan interaksi dadah–dadah pada HSA dan AAG	66
2.7.2	Implikasi pengikatan dadah pada HSA dan AAG dalam keadaan patologi	68
<b>BAB III BAHAN DAN KAEDAH</b>		
3.1	Bahan	71
3.1.1	Protein plasma, sebatian psikoaktif dan ligan penanda	71
3.1.2	Bahan kimia, pelarut organik dan air tulen	71
3.2	Penyediaan Sampel	72
3.3	Pendekatan Biofizik	73
3.3.1	Spektroskopi pendarfluor	74
3.3.2	Spektrofotokopi serapan ultraungu-tampak	75
3.3.3	Kalorimetri pentitratan isoterma	76
3.3.4	Mikroskopi daya atom	77
3.3.5	Spektroskopi dikroisme membulat	78

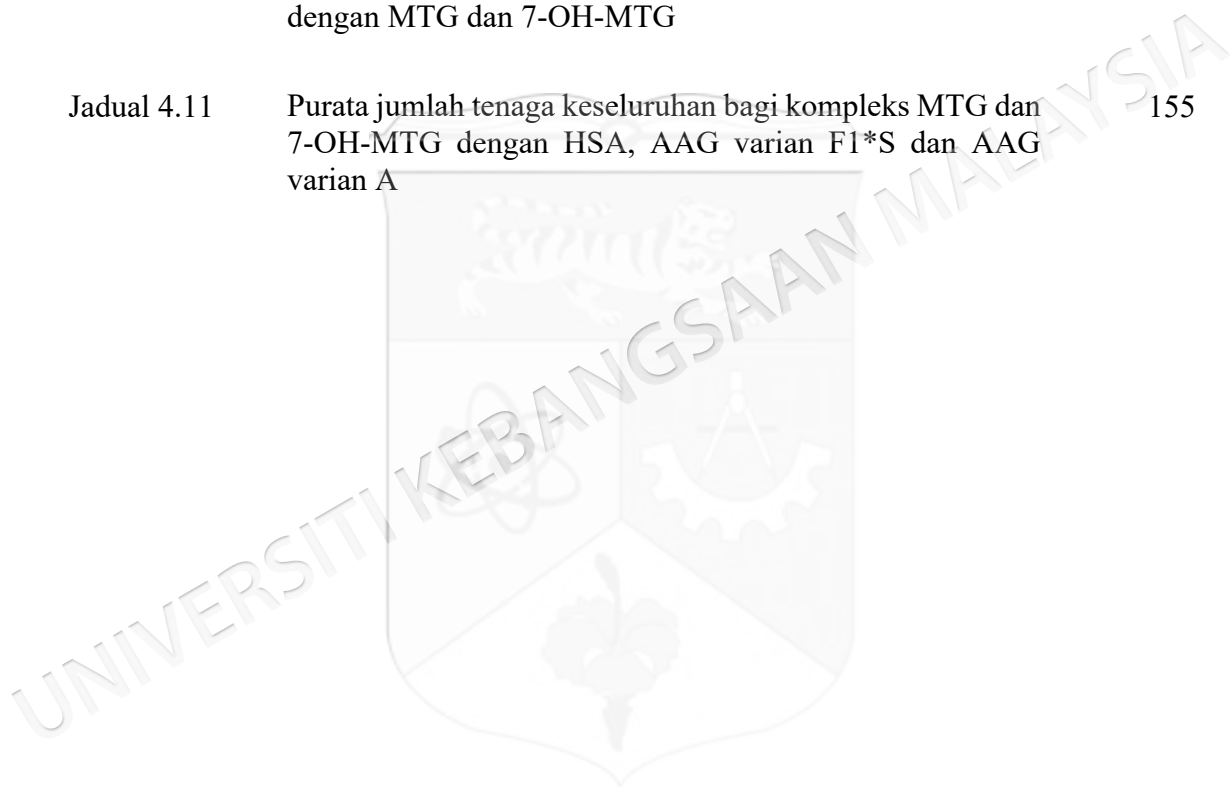
3.3.6	Kajian sesaran dadah kompetitif	79
3.3.7	Analisis statistik	80
3.4	Pendekatan Bioinformatik	80
3.4.1	Analisis struktur molekul bagi MTG dan 7-OH-MTG	81
3.4.2	Analisis dok molekul	81
3.4.3	Analisis dinamik molekul	84
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PERBINCANGAN</b>	
4.1	Analisis Keserupaan Dadah bagi Sebatian MTG dan 7-OH-MTG	86
4.1.1	Penilaian keserupaan dadah berdasarkan sifat fizikokimia	86
4.1.2	Jangkaan ciri-ciri farmakokinetik dan toksikologi	90
4.2	Parameter Pengikatan dan Termodinamik bagi Interaksi MTG dengan Protein Plasma	93
4.2.1	Analisis pentitratan pendarfluor bagi sistem MTG-HSA dan MTG-AAG	93
4.2.2	Analisis data ITC bagi kompleks MTG-HSA dan MTG-AAG	98
4.3	Kesan Interaksi MTG Terhadap Konformasi HSA dan AAG	103
4.3.1	Ciri-ciri spektrum penyerapan UV protein setelah pengikatan MTG	104
4.3.2	Perubahan struktur protein melalui spektroskopi pendarfluor 3D	107
4.3.3	Kesan MTG terhadap pengagregatan HSA dan AAG melalui analisis AFM	111
4.3.4	Kesan pengikatan MTG ke atas struktur protein melalui analisis spektrum CD	114
4.4	Lokasi Tapak Pengikatan Sebatian MTG dan 7-OH-MTG pada HSA dan AAG	119
4.4.1	Kajian penyesaran dadah kompetitif	119
4.4.2	Analisis simulasi molekul mengedok	121

4.5	Penglibatan Daya Intermolekul dalam Pengkompleksan Protein–Ligan	133
4.5.1	Analisis struktur molekul MTG dan 7-OH-MTG menggunakan perisian Chemicalize	134
4.5.2	Analisis output simulasi dok molekul menggunakan perisian Biovia Discovery Studio	140
4.6	Kesan Pengikatan MTG dan 7-OH-MTG Terhadap Kestabilan dan Kepadatan HSA dan AAG	151
4.6.1	Kestabilan dan fleksibiliti konformasi protein	151
4.6.2	Kepadatan dan perlipatan protein	157
<b>BAB V</b>	<b>KESIMPULAN</b>	
5.1	Rumusan Kajian	164
5.2	Limitasi Kajian	166
5.3	Cadangan Lanjutan	167
5.4	Prospek Masa Depan Berkaitan Ketum	169
		172
	<b>RUJUKAN</b>	
	<b>LAMPIRAN</b>	
Lampiran A	Surat Kebenaran Memiliki Bahan Psikotropik	206
Lampiran B	Simulasi Dinamik Molekul : Fail NVT.mdp	210
Lampiran C	Simulasi Dinamik Molekul : Fail NPT.mdp	211
Lampiran D	Simulasi Dinamik Molekul : Fail MD.mdp	212
Lampiran E	Senarai Penerbitan	213
Lampiran F	Senarai Persidangan	215

## SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 2.1	Taburan spesies-spesies <i>Mitragyna</i> di benua Asia dan Afrika	11
Jadual 2.2	Parameter farmakokinetik bagi MTG di dalam manusia dan haiwan	26
Jadual 2.3	Komposisi asid amino bagi protein HSA	40
Jadual 2.4	Senarai, kegunaan dan nilai pemalar asosiasi dadah yang berafiniti tinggi pada AAG varian F1*S dan A	65
Jadual 4.1	Ciri-ciri fisikokimia dan keserupaan dadah bagi sebatian MTG dan 7-OH-MTG	87
Jadual 4.2	Ramalan ciri-ciri farmakokinetik dan ketoksikan sebatian MTG dan 7-OH-MTG	91
Jadual 4.3	Parameter pengikatan dan termodinamik bagi interaksi antara MTG dengan HSA dan AAG yang diperolehi daripada pengukuran ITC pada pH 7.4 dan 25 °C	102
Jadual 4.4	Data spektrum 3D pendarfluor bagi HSA, AAG, kompleks MTG-HSA dan kompleks MTG-AAG	109
Jadual 4.5	Komposisi struktur sekunder bagi HSA dalam keadaan natif dan dalam kehadiran MTG	115
Jadual 4.6	Komposisi struktur sekunder bagi AAG dalam keadaan natif dan dalam kehadiran MTG	117
Jadual 4.7	Tenaga pengikatan terendah bagi pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada HSA dan kedua-dua varian AAG	122

Jadual 4.8	Jenis-jenis interaksi, residu asid amino yang terlibat dan jarak intermolekul dalam pengkompleksan HSA dengan MTG dan 7-OH-MTG	143
Jadual 4.9	Jenis-jenis interaksi, residu asid amino yang terlibat dan jarak intermolekul dalam pengkompleksan AAG varian F1*S dengan MTG dan 7-OH-MTG	146
Jadual 4.10	Jenis-jenis interaksi, residu asid amino yang terlibat dan jarak intermolekul dalam pengkompleksan AAG varian A dengan MTG dan 7-OH-MTG	149
Jadual 4.11	Purata jumlah tenaga keseluruhan bagi kompleks MTG dan 7-OH-MTG dengan HSA, AAG varian F1*S dan AAG varian A	155



## SENARAI ILUSTRASI

<b>No. Rajah</b>		<b>Halaman</b>
Rajah 2.1	Tumbuhan <i>Mitragyna speciosa</i> (ketum)	12
Rajah 2.2	Struktur kimia 2D bagi MTG	20
Rajah 2.3	Struktur kimia 2D bagi 7-OH-MTG	27
Rajah 2.4	Kaedah-kaedah bagi penentuan afiniti pengikatan protein dan dadah	36
Rajah 2.5	Struktur 3D kristal HSA (PDB: 1BM0)	41
Rajah 2.6	Gambaran skematik struktur sekunder dan titian dwisulfida bagi topologi protein HSA	43
Rajah 2.7	Lokasi tapak pengikatan pelbagai ligan pada HSA	47
Rajah 2.8	Lokasi kawasan Ia, Ib dan Ic di tapak pengikatan I HSA dengan ligan penanda tapak I	49
Rajah 2.9	Penjajaran jujukan dan superposisi struktur bagi kedua-dua isoform varian AAG manusia	57
Rajah 2.10	Struktur 3D kristal AAG bagi (A) varian F1*S (PDB: 3KQ0) dan (B) varian A (PDB: 3APU)	58
Rajah 2.11	Perbandingan saku pengikatan dadah di dalam varian F1*S dan A AAG	63
Rajah 3.1	Carta alir kajian yang melibatkan teknik biofizik	73
Rajah 3.2	Carta alir kajian yang melibatkan teknik bioinformatik	80
Rajah 4.1	(A) Spektrum pendarfluor dan (B) penyerapan UV-Vis bagi MTG bebas	94

Rajah 4.2	(A) Pemelindapan pendarfluor HSA dengan kehadiran MTG berkepekatan semakin meningkat. (B) Plot $(F_0 - F)/(F_0 - F_C)$ melawan [MTG] bagi interaksi MTG-HSA	95
Rajah 4.3	(A) Peningkatan pendarfluor AAG dengan kehadiran MTG berkepekatan semakin meningkat. (B) Plot $(F_0 - F)/(F_0 - F_C)$ melawan [MTG] bagi interaksi MTG-AAG	96
Rajah 4.4	Profil kalorimetri pentitratan isoterma bagi interaksi di antara HSA dengan MTG	99
Rajah 4.5	Profil kalorimetri pentitratan isoterma bagi interaksi di antara AAG dengan MTG	100
Rajah 4.6	(A) Spektrum penyerapan UV bagi 20 $\mu\text{M}$ HSA tanpa (biru) dan dengan kehadiran MTG (6, 12 dan 20 $\mu\text{M}$ ). (B) Spektrum yang dijana daripada penjumlahan nilai penyerapan HSA bebas (20 $\mu\text{M}$ ) dan MTG bebas (6, 12 dan 20 $\mu\text{M}$ ). (C) Graf tindakan membandingkan spektrum dari panel A (garis penuh) dan panel B (garis putus-putus)	105
Rajah 4.7	(A) Spektrum penyerapan UV bagi 20 $\mu\text{M}$ AAG tanpa (biru) dan dengan kehadiran MTG (6, 12 dan 20 $\mu\text{M}$ ). (B) Spektrum yang dijana daripada penjumlahan nilai penyerapan AAG bebas (20 $\mu\text{M}$ ) dan MTG bebas (6, 12 dan 20 $\mu\text{M}$ ). (C) Graf tindakan membandingkan spektrum dari panel A (garis penuh) dan panel B (garis putus-putus)	106
Rajah 4.8	Unjuran spektrum pendarfluor 3D dan peta kontur bagi (AI) 3 $\mu\text{M}$ HSA, (AII) kompleks MTG-HSA (6 $\mu\text{M}$ MTG + 3 $\mu\text{M}$ HSA), (BI) 3 $\mu\text{M}$ AAG dan (BII) kompleks MTG-AAG (6 $\mu\text{M}$ MTG + 3 $\mu\text{M}$ AAG) yang direkodkan pada 25 $^{\circ}\text{C}$	108
Rajah 4.9	Unjuran spektrum pendarfluor 3D dan peta kontur bagi (A) penimbal dan (B) 6 $\mu\text{M}$ MTG yang direkodkan pada 25 $^{\circ}\text{C}$	110
Rajah 4.10	Imej topografi AFM 2D dan 3D bagi (AI) HSA bebas dan (BI) kompleks MTG-HSA. Imej topologi AFM 3D yang sepadan ditunjukkan pada (AII) bagi HSA bebas dan (BII) kompleks MTG-HSA	112

Rajah 4.11	Imej topografi AFM 2D bagi (AI) AAG bebas dan (BI) kompleks MTG–AAG. Imej topologi AFM 3D yang sepadan ditunjukkan pada (AII) bagi AAG bebas dan (BII) kompleks MTG–AAG	113
Rajah 4.12	Kesan interaksi MTG–HSA ke atas struktur sekunder dan tertier HSA. Spektrum UV-jauh (A) dan UV-dekat (B) bagi HSA dan campuran MTG–HSA	115
Rajah 4.13	Kesan interaksi MTG–AAG ke atas struktur sekunder dan tertier AAG. Spektrum UV-jauh (A) dan UV-dekat (B) bagi AAG dan campuran MTG–AAG	117
Rajah 4.14	Penyesaran ligan penanda dari tapak pengikatan HSA oleh MTG (5–30 $\mu\text{M}$ dengan selang 5 $\mu\text{M}$ ) yang diperhatikan melalui perubahan intensiti pendarfluor relatif (FI) HSA (3 $\mu\text{M}$ ) dan kompleksnya (1:1) dengan PB untuk tapak I, KTN untuk tapak II dan HMN untuk tapak III	120
Rajah 4.15	Analisis kluster dok molekul bagi MTG dengan HSA secara (A) rawak dan (B) spesifik	123
Rajah 4.16	Analisis kluster dok molekul bagi 7-OH-MTG dengan HSA secara (A) rawak dan (B) spesifik	125
Rajah 4.17	Model molekul mengedok (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG pada HSA (ID PDB: 1BM0) yang menunjukkan orientasi pengikatan bagi konformasi ligan yang paling stabil (kelabu) dengan tenaga pengikatan terkuat	126
Rajah 4.18	Analisis kluster dok molekul MTG dan 7-OH-MTG dengan AAG varian (A) F1*S dan (B) A	128
Rajah 4.19	Model molekul mengedok (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG pada AAG varian F1*S (ID PDB: 3KQ0) yang menunjukkan orientasi pengikatan bagi konformasi ligan yang paling stabil (hijau) dengan tenaga mengedok terkuat	130
Rajah 4.20	Model molekul mengedok (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG pada AAG varian A (ID PDB: 3APU) yang menunjukkan	131

orientasi pengikatan bagi konformasi ligan yang paling stabil (hijau) dengan tenaga mengedok terkuat

Rajah 4.21	Perbandingan antara orientasi ligan tetraetilena glikol yang dikristalkan (biru) dan yang didokkan semula (merah) dengan AAG varian A (PDB ID: 3APU)	133
Rajah 4.22	Taburan dua mikrospecies MTG yang hadir pada skala pH 0–14	135
Rajah 4.23	Taburan empat mikrospecies 7-OH-MTG yang hadir pada skala pH 0–14	136
Rajah 4.24	Lengkuk cas melawan pH bagi molekul (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG	137
Rajah 4.25	Lengkuk logD bagi molekul MTG dan 7-OH-MTG melawan pH	138
Rajah 4.26	Gambar rajah skematik bagi interaksi residu asid amino HSA dengan (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG	142
Rajah 4.27	Gambar rajah skematik bagi interaksi residu asid amino AAG varian F1*S dengan (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG	145
Rajah 4.28	Gambar rajah skematik Biovia Discovery Studio bagi interaksi residu asid amino AAG varian A dengan (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG	148
Rajah 4.29	Plot RMSD bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1*S dan (C) AAG varian A dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG melawan masa simulasi	152
Rajah 4.30	Plot tenaga keseluruhan bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1*S dan (C) AAG varian A tanpa dan dengan kehadiran (I) MTG dan (II) 7-OH-MTG (II) melawan masa simulasi	154
Rajah 4.31	Plot RMSF bagi HSA dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG yang disusun mengikut subdomain	156

Rajah 4.32	Plot RMSF bagi AAG varian F1*S dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG	158
Rajah 4.33	Plot RMSF bagi AAG varian A dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG	159
Rajah 4.34	Plot jejari legaran bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1*S dan (C) AAG varian A tanpa dan dengan kehadiran MTG dan 7-OH-MTG melawan masa simulasi	161
Rajah 4.35	Plot SASA bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1*S dan (A) AAG varian A tanpa dan dengan MTG dan 7-OH-MTG melawan masa simulasi	162



## SENARAI SINGKATAN

Penggunaan Dalam Bahasa Melayu		Penggunaan Dalam Bahasa Inggeris	
2D	2-dimensi	AIDS	<i>Acquired</i>
3D	3-dimensi		<i>immunodeficiency</i>
5-HT	5-hidroksitriptamina		<i>syndrome</i>
7-OH-MTG	7-hidroksimitraginin	Caco-2	<i>Cancer coli-2</i>
Å	Angstrom	CD14	<i>Cluster of differentiation</i>
AAG	Glikoprotein asid- $\alpha_1$		<i>14</i>
AFM	Mikroskopi daya atom	CD163	<i>Cluster of differentiation</i>
Ala	Alanina		<i>163</i>
Arg	Arginina	COVID	<i>Corona virus disease</i>
Asp	Asid aspartik	FST	<i>Forced swim test</i>
Asn	Asparagina	GTP $\gamma$ S	<i>Guanosine 5'-O-</i>
AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub>	Keluasan dibawah lengkung dari masa sama dengan sifar hingga afiniti		<i>[gamma-thio]</i> <i>triphosphate</i>
AZT	3'-azida-3'- deoksitimidina	HDL	<i>High density lipoprotein</i>
BBB	Penembusan rintangan darah otak	LD <sub>50</sub>	<i>Lethal dose 50</i>
BR	Bilirubin	LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
CD	Dikroisme membulat	LINCS	<i>The LINear Constraint</i>
CL	Pembersihan		<i>Solver</i>
C <sub>max</sub>	Kepekatan maksimum	MDR-	<i>Multiple drug resistant-</i>
CMPF	3-karboksi-4-metil-5- propil-2-furanpronoik	MDCK	<i>Madin-Darby canine</i>
cm	sentimeter		<i>kidney</i>
CRP	Protein C-reaktif	MMP9	<i>Matrix metalloproteinase</i>
			<i>9</i>
		PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
		PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
		THP-1	<i>Tamm-Horsfall protein 1</i>
		TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>

CYP	Sitokrom	TST	<i>Tail suspension test</i>
Cys	Sisteina	UGT	<i>Uridin 5'-difosfo-</i> <i>glukuronosiltransferase</i>
DIS	Asid di-iodosalisilik		
DNSA	Dansil- L -asparagin	VLDL	<i>Very low density</i> <i>lipoprotein</i>
DOR	Reseptor opioid $\delta$		
DPPH	Difenil-1-pikrilhidrazil		
ED	Dialisis keseimbangan		
EDTA	Etilenadiaminatetraasetik		
FA	Asid lemak		
FTIR	Transformasi Fourier inframerah		
fu	Fraksi bebas		
fu <sub>mic</sub>	Fraksi bebas plasma tikus		
g	Gram		
GABA	Asid gamma- aminobutirik		
Gly	Glisina		
Gln	Glutamina		
Glu	Asid glutamik		
GLUT1	Pengangkut glukosa 1		
gmol <sup>-1</sup>	Gram per mol		
His	Histidina		
HIV	Virus kurang daya tahan manusia		
HMN	Hemin		
HPAC	Kromatografi keafinan prestasi tinggi		
HSA	Albumin serum manusia		
Hz	Hertz		
Ig	Imunoglobulin		

IL	Interleukin
Ile	Isoleusin
ITC	Kalorimetri pentitratan isoterma
$K_a$	Pemalar asosiasi
$K_d$	Pemalar ceraian
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
$K_i$	Pemalar perencatan
KOR	Reseptor opioid $\kappa$
KTN	Ketoprofen
L	Liter
Leu	Leusin
Lys	Lisina
M	Molar
mAO-b	Monoamina oksidase b
MD	Dinamik molekul
Met	Metionina
mg	Miligram
min	Minit
mL	Mililiter
MOR	Reseptor opioid $\mu$
MRI	Pengimejan resonans magnet
mRNA	Asid ribonukleik pengutus
MTG	Mitraginin
nm	Nanometer

NMR	Resonans magnet nukleus
OCT-02	Pengangkut kation organik 2
ORM	Orosomuroid
P-gp	P-glikoprotein
PB	Fenilbutazon
PDT	Terapi fotodinamik
Phe	Fenilalanin
PMT	Tiub pemfotoganda
Pro	Prolin
PTT	Terapi fototerma
RED	Dialisis keseimbangan cepat
Rg	Jejari legaran
RMSD	Punca min sisihan kuasa dua
RMSF	Dan fluktuasi punca min kuasa dua
RNS	Spesies reaktif nitrogen
ROS	Spesies reaktif oksigen
s	Saat
SAR	Hubungan struktur-aktiviti
SASA	Kawasan permukaan yang boleh diakses pelarut
Ser	Serina
SLE	Lupus eritematosus Sistemik

SPR	Resonans plasmons permukaan
$t_{1/2}$	Separuh hayat
TEM	Trombelastometri
TIB	Asid tri-iodobenzoik a
Tyr	Tirosin
$T_{max}$	Masa maksimum
TNF- $\alpha$	Faktor nekrosis tumor- alfa
TPSA	Topologi kawasan permukaan berkutub
Thr	Treonina
Trp	Triptofan
UF	Ultrapenurasan
UV	Ultralembayung
UV-Vis	Ultralembayung dan tampak
V	Voltan
Val	Valina
$V_d$	Isipadu sebaran
$\epsilon$	Molar ekstinksi
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{m}$	Mikrometer
%	Peratusan
$^{\circ}\text{C}$	Darjah celcius
$n$	Stoikiometri
$\Delta H$	Entalpi
$\Delta G$	Tenaga bebas Gibbs
$\Delta S$	Entropi

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 PENGENALAN

*Mitragyna speciosa*, atau ketum, merupakan tumbuhan herba yang berasal daripada famili Rubiaceae. Taburan tumbuhan ini meluas di beberapa kawasan tropika Asia Tenggara termasuklah Thailand, Malaysia dan Indonesia. Ia sering digunakan dalam perubatan tradisional untuk merawat cirit-birit, kencing manis, sakit otot, darah tinggi dan meningkatkan tenaga (Meireles et al. 2019; Grundmann, Hendrickson & Greenberg 2022). Ekstrak mentah tumbuhan ini mempamerkan bioaktiviti seperti antinosisseptif, analgesik, antidepresan, ansiolitik, antimikrob, sifat relaksan otot dan anti-keradangan (Hossain et al. 2023). Oleh sebab sifat psikoaktifnya, ketum juga terkenal sebagai bahan rekreasi untuk mencapai euforia dan ketenangan (Cinosi et al. 2015; Karunakaran et al. 2022). Bahkan, ia boleh digunakan dalam rawatan ketagihan opioid bagi mengurangkan kebergantungan penagih kepada dadah opioid dan menangani sindrom sarak (Yusoff et al. 2016). Bagaimanapun, tumbuhan ini juga sinonim dengan risiko penyalahgunaan dan ketagihan disebabkan oleh kehadiran sebatian-sebatian psikoaktifnya.

Terdapat dua alkaloid utama yang bertanggungjawab untuk kesan farmakologi tumbuhan ini iaitu mitraginin (MTG) dan 7-hidroksimitraginin (7-OH-MTG). MTG merupakan sebatian alkaloid utama ketum dengan komposisi sebanyak 12–66%, manakala sebatian terbitannya, 7-OH-MTG mempunyai komposisi jauh lebih rendah iaitu 0.01–2% daripada jumlah keseluruhan alkaloid dalam daun ketum, namun mempunyai tindak balas farmakologi yang lebih poten (Berthold et al. 2022; Orio et al. 2012; Ponglux et al. 1994;

Takayama 2004). Kedua-dua sebatian psikoaktif ini bertindak sebagai agonis separa reseptor opioid  $\mu$  (MOR) yang dipengaruhi oleh isyarat G protein tanpa melibatkan tapak jalan  $\beta$ -arrestin dan juga sebagai antagonis kompetitif pada reseptor opioid  $\delta$  (DOR) dan reseptor opioid  $\kappa$  (KOR) (Kruegel et al. 2016; Obeng et al. 2020). Meskipun kedua-dua sebatian ini adalah agonis MOR, namun kajian *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahawa sebatian 7-OH-MTG adalah 13 lebih poten berbanding dengan morfin dan 46 kali lebih poten daripada MTG (Takayama 2004). Selain itu, kedua-dua sebatian ini juga mempengaruhi tapak jalan serotonergik, dopaminergik dan adrenergik (Ellis et al. 2020; Obeng et al. 2020). Walaupun kesan farmakologi sebatian-sebatian ini telah banyak diselidik dan dihuraikan (Karunakaran et al. 2022; Kong et al. 2017a; Kruegel et al. 2016), namun penggunaan dan implikasi klinikal masih belum didokumenkan. Pada dasarnya, interaksi MTG dan 7-OH-MTG dengan protein plasma yang mempengaruhi ciri-ciri farmakokinetiknya juga belum dijelaskan secara terperinci.

Di dalam sistem peredaran manusia, sifat farmakologi dadah sangat dipengaruhi oleh interaksinya dengan protein plasma. Pengikatan dengan protein plasma boleh memberi kesan terhadap ciri-ciri *in vivo* seperti penyerapan, bioketerdapatan, taburan, penyingkiran dan metabolisme (Deb et al. 2018). Ini seterusnya membawa kepada peningkatan keterlarutan dalam plasma, penurunan tahap ketoksikan, perlindungan daripada radikal bebas dan jangka hayat *in vivo* molekul terikat yang berpanjangan (Bohnert & Gan 2013; Ezike et al. 2023). Namun, sebatian yang terikat kepada protein plasma tidak dapat berinteraksi dengan reseptor terapeutik kerana keupayaannya terhad untuk menghasilkan respons farmakologi yang diinginkan. Sebaliknya, ligan tak terikat dengan protein mudah melalui proses metabolisme dan seterusnya disingkirkan daripada badan (Smith & Rowland 2019). Maka, penyaringan pengikatan sebatian terapeutik dengan protein plasma dipiawaikan sebagai langkah pertama dalam perekaan bentuk dadah (Vuignier et al. 2010).

Albumin serum manusia (HSA) dan glikoprotein asid- $\alpha_1$  (AAG) merupakan dua protein plasma utama yang berfungsi sebagai pengangkut metabolit dan sebatian eksogen di dalam sistem peredaran manusia (Bteich 2019). HSA adalah polipeptida rantaian tunggal yang terdiri daripada 585 asid amino dan kepekataannya merangkumi 50–60% daripada

jumlah keseluruhan protein plasma. Dalam konteks biologi, HSA memainkan peranan penting dalam tekanan osmotik koloid, penstabilan pH darah dan sebagai agen antioksidan (Bairagi, Mittal & Mishra 2015). HSA bertanggungjawab bagi pengikatan dadah berasid, tetapi juga mampu mengikat sebahagian dadah bersifat neutral dan berbes (Yamasaki et al. 2013). Komposisi struktur sekunder HSA meliputi 67% heliks- $\alpha$ , 10% lembaran- $\beta$  dan selebihnya adalah kawasan yang fleksibel di antara subdomain iaitu sebanyak 23% (Carter & Ho 1994). Bentuk struktur kristal protein ini mirip jantung dan memiliki tiga domain homolog (I, II dan III), yang dibahagikan kepada subdomain A dan B. Terdapat beberapa tapak pengikatan yang menjadi pilihan untuk pengikatan pelbagai sebatian heterosiklik dan aromatik iaitu tapak pengikatan dadah I atau dikenali tapak Sudlow I pada subdomain IIA dan tapak pengikatan dadah II atau dikenali tapak Sudlow II pada subdomain IIIA (Al-Harthi et al. 2019). Selain itu, terdapat juga pelbagai sebatian farmaseutikal yang mengikat pada tapak pengikatan lain yang terletak di subdomain IB dan menyebabkan ia dirujuk sebagai tapak pengikatan dadah III (Zsila 2013). HSA juga merupakan protein fasa akut negatif yang menerangkan penurunan kepekatan protein ini terutamanya dalam penyakit ginjal seperti sindrom nefrotik, kegagalan ginjal kronik dan uremia (Ascenzi et al. 2014).

AAG, atau juga dikenali orosomuroid merupakan sejenis glikoprotein rantaian tunggal yang terdiri daripada 183 asid amino dan mempunyai kandungan karbohidrat yang tinggi iaitu melebihi 45% berat molekulnya (Luo et al. 2015). Komposisi struktur sekunder AAG adalah 25.7% heliks- $\alpha$ , 39.3% lembaran- $\beta$  dan 35% struktur gegelung (Schönfeld et al. 2008). Ia berfungsi sebagai depot utama untuk pengikatan pelbagai dadah lipofilik berbes dan neutral di dalam plasma manusia. AAG mempunyai tujuh tapak pengikatan dengan ciri-ciri berbeza, tetapi hanya satu tapak pengikatan di tengah protein yang berperanan penting untuk pengikatan dadah dan pengedarannya dalam tubuh badan (Owczarzy et al. 2023). Terdapat dua bentuk polimorfik utama bagi protein AAG iaitu varian genetik F1\*S dan A. Kedua-dua varian AAG ini mempunyai perbezaan lebih 20 asid amino dan menunjukkan selektiviti dalam pengikatan ligan (Nishi et al. 2011). AAG juga bertindak sebagai agen anti-radang dan berperanan penting dalam imunomodulasi (Bi et al. 2017). Di samping itu, AAG juga dikenali sebagai protein fasa akut positif yang

menjelaskan perubahan secara drastik kepekatan AAG semasa tindak balas kepada trauma, jangkitan, penyakit akut dan keradangan (Smith & Waters 2019).

Secara ringkasnya, MTG dan 7-OH-MTG merupakan alkaloid indol yang mempunyai nilai terapeutik yang tinggi dan penting sebagai alternatif kepada opiat. Di dalam sistem manusia, sifat farmakokinetik kedua-dua sebatian psikoaktif ini dikaitkan dengan pengikatannya dengan protein plasma. Lantaran itu, penyelidikan ini dilakukan bertujuan untuk memahami mekanisme interaksi sebatian MTG dan 7-OH-MTG dengan protein pengangkut utama manusia, HSA dan AAG secara komprehensif.

## 1.2 PERNYATAAN MASALAH

Ketum sering digunakan oleh penduduk luar bandar di Asia Tenggara dalam perubatan tradisional sebagai agen analgesik untuk melegakan kesakitan dan agen peransang ringan untuk mengurangkan keletihan badan (Grundmann, Hendrickson & Greenberg 2022). Di utara Semenanjung Malaysia, pengguna tegar mengkonsumsi dua sehingga lima gelas air ketum setiap hari dengan anggaran kandungan MTG antara 76 mg hingga 115 mg. Pada dos ini, ketum tidak dikaitkan dengan kesan kesihatan serius atau kesan toksik, namun hanya dikaitkan dengan simptom kesakitan sederhana dan masalah tidur (Singh et al. 2018). Kesan ketum pada manusia bergantung pada kuantitinya; dos rendah menghasilkan tindak balas ransangan, sementara dos tinggi menyebabkan kesan sedatif-narkotik (Prozialeck, Jivan & Andurkar 2012). Manakala, kawasan di Selatan Thailand dengan sejarah dan budaya penggunaan ketum yang kuat mendedahkan bahawa 75% penduduk Tambon Namphu di Selatan Thailand adalah pengguna harian dan 19% pula adalah pengguna ketum sesekali. Data tinjauan ini juga mendapati bahawa 12% penduduk menggunakan ketum untuk merawat pelbagai penyakit (Charoenratana, Anukul & Aramrattana 2021).

Walaupun ketum mempunyai sejarah etnofarmakologi sejak berabad-abad lamanya di Asia Tenggara, namun populariti ketum meningkat secara dramatik di Barat sekitar 20 tahun yang lalu, terutamanya di Amerika Syarikat (Henningfield, Fant & Wang 2018). Dianggarkan kira-kira 1.7 juta rakyat Amerika yang berumur 12 tahun ke atas

menggunakan ketum pada tahun 2021, menurut Tinjauan Penggunaan Dadah dan Kesihatan Kebangsaan oleh Pentadbiran Penyalahgunaan Bahan dan Perkhidmatan Kesihatan Mental (*Substance Abuse and Mental Health Services Administration*). Walau bagaimanapun, ini juga disertai dengan peningkatan bilangan kes ketoksikan yang berkaitan dengan penggunaan ketum dalam rawatan ketagihan opioid (Grundmann, Hendrickson & Greenberg 2022; Prozialeck et al. 2019; Saref et al. 2019). Penyalahgunaan ketum bersama bahan lain telah menimbulkan kebimbangan mengenai keselamatan dan keberkesannya. Ini menyebabkan ketum dan sebatian derivatifnya telah diharamkan di beberapa negara, termasuklah Australia, Malaysia dan Myanmar (Charoenratana, Anukul & Aramrattana 2021). Penggunaan ketum sering dikaitkan dengan penyalahgunaan dadah dan ketagihan disebabkan oleh kehadiran bahan psikoaktif, terutamanya MTG dan 7-OH-MTG.

Ciri-ciri farmakokinetik agen terapeutik seperti MTG dan 7-OH-MTG di dalam sistem manusia berkolerasi dengan interaksinya bersama protein plasma khususnya, HSA dan AAG. Molekul kecil yang mengikat kepada protein plasma boleh membawa kepada perubahan profil farmakokinetik yang berkaitan pendedaran dadah, mempengaruhi ketersediaannya pada tisu sasaran dan memodifikasi metabolisme atau penyingkirannya. Sementara itu, pengikatan serentak dadah-dadah lain di dalam sistem protein–ligan boleh mempengaruhi kesan terapeutiknya dan menghasilkan kesan sampingan yang buruk (Tayyab & Feroz 2021; Yamasaki et al. 2013). Oleh itu, penilaian pengikatan protein plasma bagi sebatian terapeutik dianggap sebagai langkah kritikal dalam reka bentuk dan pembangunan ubat. Dalam kes ketum, penggunaannya bersama ubat lain seperti propilheksedrina (Holler et al. 2011) dan O-desmetiltramadol (Kronstrand et al. 2011) telah terbukti menyebabkan interaksi ubat yang tidak baik, menyebabkan risiko kesihatan yang serius dan bahkan kematian. Walau bagaimanapun, sehingga kini tiada penyelidikan terperinci mengenai interaksi MTG dan 7-OH-MTG dengan HSA dan AAG; sebaliknya, hanya terdapat kajian mengenai pengikatan MTG dan 7-OH-MTG dengan sampel keseluruhan protein plasma yang telah dikaji (Manda et al. 2014; Obeng et al. 2020; Yusof et al. 2019).

Sehubungan itu, penyelidikan ini dijalankan dengan memfokuskan kepada pencirian interaksi sebatian-sebatian bioaktif ketum (MTG dan 7-OH-MTG) dengan HSA dan AAG menggunakan teknik biofizik dan bioinformatik. Teknik biofizik melibatkan multispektoskopi (pendarfluor, dikroisme membulat, serapan), kalorimetri dan mikroskopi yang digunakan untuk menentukan afiniti pengikatan, kesan pengikatan terhadap struktur protein dan penentuan lokasi pengikatan menggunakan kajian sesaran dadah kompetitif. Selanjutnya, kajian ini dilanjutkan menggunakan teknik bioinformatik termasuklah analisis dok molekul dan dinamik molekul. Simulasi dok molekul dilakukan untuk mengesahkan data eksperimen dan memberikan maklumat mengenai daya intermolekul yang terlibat. Analisis simulasi dinamik molekul dijalankan untuk memperoleh maklumat mengenai kestabilan, ketegaran dan kepadatan kompleks protein–ligan plasma. Tambahan juga, ujian keserupaan dadah dan profil farmakokinetik dinilai menggunakan output informasi daripada perisian SwissADME, OSIRIS Property Explorer dan pkCSM.

Secara keseluruhannya, kajian mekanisme pengikatan antara sebatian psikoaktif ketum dengan protein plasma ini adalah penting bagi memahami sifat-sifat farmakokinetik sebatian-sebatian psikoaktif ini dalam keadaan fasa normal dan akut. Hasil yang diperoleh akan dianalisis untuk menilai sifat fisiologi seperti keberkesanan, ketoksikan dan kesan sampingan. Ini seterusnya boleh menyumbang kepada pembangunan agen terapeutik terbitan daripada sebatian ketum yang stabil dan berkesan pada masa hadapan.

### 1.3 HIPOTESIS KAJIAN

Terdapat beberapa kajian lepas melaporkan bahawa sebatian MTG dan 7-OH-MTG mengikat kuat pada protein plasma iaitu melebihi 90%, dengan MTG mempamerkan pengikatan protein plasma yang lebih tinggi berbanding 7-OH-MTG (Manda et al. 2014; Obeng et al. 2020; Yusof et al. 2019). Protein plasma ini terdiri daripada pelbagai komponen, termasuklah HSA, globulin- $\alpha$ 1 (AAG, anti-trypsin- $\alpha$ 1), globulin- $\alpha$ 2 (haptoglobulin, ceroplasmin), globulin- $\beta$  (protein reaktif C, transferin), globulin- $\gamma$  (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), lipoprotein (HDL, LDL, VLDL dan kilomikron) dan fibrinogen (Bteich 2019). Walaupun terdapat banyak komponen dalam plasma mampu mengikat

dadah, namun fokus utama kajian ini tertumpu kepada HSA dan AAG. Kedua-dua protein plasma ini berperanan penting sebagai protein pengangkut dan juga merupakan protein fasa akut dalam pelbagai keadaan klinikal. Maka, kajian ini menjangkakan bahawa sebatian MTG dan 7-OH-MTG berkemungkinan mengikat pada protein plasma utama dalam sistem peredaran manusia iaitu HSA dan AAG dengan keafinan yang tinggi.

Tambahan juga, struktur sebatian bioaktif memberikan maklumat mengenai sifat fizikokimia boleh digunakan untuk menentukan profil pengikatan sebatian tersebut dengan protein plasma. Dalam penyelidikan ini, sebatian MTG dan 7-OH-MTG dikategorikan dalam kumpulan indol iaitu sebatian organik heterosiklik aromatik yang mengandungi gelang benzena dan pirola. Menariknya, beberapa kajian terdahulu mengenai sebatian terbitan indol menunjukkan didapati mengikat kuat pada tapak pengikatan dadah HSA (Khastar et al. 2020; Pawar, Kalalbandi & Jaldappagari 2018). Bukan hanya mengikat pada HSA, sebatian terbitan indol juga didapati mengikat pada tapak pengikatan di tengah protein AAG dengan afiniti pengikatan yang kuat (Bohnert & Gan 2013; Israili & Dayton 2001; Landin et al. 2021).

Oleh kerana itu, jangkaan awal daripada ulasan ini boleh dirumuskan bahawa berlakunya interaksi di antara sebatian fitokimia ketum (MTG dan 7-OH-MTG) dengan protein plasma manusia utama iaitu HSA dan AAG yang boleh dinilai menerusi pendekatan biofizik dan bioinformatik. Sebatian MTG dan 7-OH-MTG berkemungkinan mengikat pada salah satu tapak pengikatan dadah HSA dan berinteraksi dengan residu asid amino di tengah protein AAG berbanding tapak pengikatan yang lain, serupa dengan sebatian terbitan indol lainnya. Oleh demikian, profil pengikatan MTG dan 7-OH-MTG terhadap HSA dan AAG dan ciri-ciri farmakokinetiknya diramalkan sama seperti mana alkaloid indol yang lain.

#### **1.4 OBJEKTIF KAJIAN**

Secara amnya, penyelidikan ini dijalankan bertujuan untuk mengkaji ciri-ciri interaksi sebatian fitokimia daripada *M. speciosa* dengan protein pengangkut manusia utama

menggunakan teknik biofizik dan bioinformatik. Objektif spesifik penyelidikan ini adalah seperti berikut:

- 1) Menilai kesesuaian sebatian MTG dan 7-OH-MTG sebagai calon dadah berdasarkan ciri-ciri farmakokinetik dan farmakodinamik secara *in silico*.
- 2) Menentukan afiniti pengikatan dan parameter termodinamik bagi interaksi sebatian MTG dengan HSA dan AAG melalui analisis pentitratan pendarfluor dan data ITC.
- 3) Mengenalpasti lokasi tapak pengikatan sebatian MTG pada HSA menggunakan eksperimen sesaran dadah kompetitif dan lokasi tapak pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada HSA dan AAG secara *in silico*.
- 4) Menentukan daya intermolekul yang terlibat di antara MTG dan 7-OH-MTG dengan residu-residu asid amino HSA dan AAG secara *in silico*.
- 5) Menyiasat kesan interaksi MTG dan 7-OH-MTG terhadap struktur HSA dan AAG secara *in vitro* dan *in silico*.

## 1.5 RASIONAL KAJIAN

Sifat farmakokinetik dan farmakodinamik sebatian alkaloid ketum di dalam sistem manusia dipengaruhi oleh interaksinya dengan protein plasma dan belum sepenuhnya dijelaskan sebelum ini. Oleh kerana itu, penyelidikan ini menjadi yang pertama untuk mencirikan profil pengikatan MTG dan 7-OH-MTG secara menyeluruh terhadap dua protein pengangkut utama manusia, HSA dan AAG. Hasil penyelidikan ini membekalkan maklumat mengenai keberkesanan dan komplikasi yang berkemungkinan dipengaruhi oleh sebatian-sebatian ketum.

Penyediaan dan penggunaan ekstrak ketum dengan berlebihan dos, jangka masa panjang dan digunakan bersamaan dadah lain telah diketahui beracun dan berbahaya yang boleh membawa kepada maut. Maka, dapatan kajian ini boleh memperluaskan aspek keselamatan dan potensi sebatian bioaktif ketum sebagai agen terapeutik dalam bidang perubatan moden. Ia juga boleh diaplikasikan dalam mempertingkatkan asas dan penemuan

saintifik ke arah perubatan seperti rawatan intervensi berasaskan ketum. Ini seterusnya mampu mengembangkan formulasi yang sesuai untuk meningkatkan lagi kelarutan, kestabilan dan penyerapan oral sebatian terapeutik ketum untuk kesan yang lebih baik.

Selain itu, ketum sering diaplikasikan dalam perubatan tradisional, namun ia juga popular sebagai bahan psikoaktif yang memberi konotasi yang negatif kepada tumbuhan ini. Maka, adalah suatu keperluan untuk menjalankan kajian meluas dan berkualiti tinggi untuk menilai manfaat dan risiko perubatan ketum untuk meningkatkan kesedaran kepada masyarakat. Hasil kajian ini mampu mengubah persepsi masyarakat terhadap ketum sebagai sumber semulajadi yang mempunyai nilai perubatan dan bukan hanya diklasifikasi sebagai bahan psikoaktif rekreasi semata-mata. Bukan hanya itu sahaja, pemahaman mekanisme interaksi ini juga boleh bermanfaat dalam pengubalan undang-undang dengan merumuskan panduan khusus yang boleh dipercayai untuk pengelolaan pengambilan dan penggunaan produk-produk berkaitan ketum.

Tambahan lagi, dengan adanya bukti potensi terapeutik sebatian-sebatian ketum melalui kajian ini, hal ini boleh menjadi dorongan dalam transformasi industri herba tempatan dan menggalakkan pembangunan ekonomi nasional. Ini juga selaras dengan Dasar Nasional Kepelbagaian Biologi (2016–2025), yang mana kajian ini akan menjadi langkah untuk meneroka potensi tanaman asli Malaysia sebagai sumber agen terapeutik. Ketum adalah salah satu tumbuhan yang tinggi nilainya khususnya di pasaran luar negara serta mudah ditanam. Ketum berpotensi dikomersialkan sebagai alternatif kepada metadon dan dadah lain yang lebih mahal bagi merawat pesakit yang mengalami ketagihan opioid.

Kesimpulannya, faedah yang diperoleh dalam kajian ini melibatkan beberapa isu kontemporari berkaitan dengan penggunaan ketum termasuklah pengetahuan saintifik berguna, pencegahan kesan sampingan, sokongan fasa klinikal dan pembangunan ekonomi negara. Dengan demikian, penyelidikan ini memberikan sumbangan yang penting terhadap pemahaman dan perkembangan sektor tumbuhan herba tempatan.

## BAB II

### ULASAN KEPUSTAKAAN

#### 2.1 *Mitragyna speciosa* (KORTH.)

*M. speciosa* merupakan tumbuhan herba psikoaktif yang berasal daripada famili yang sama dengan kopi, iaitu Rubiaceae. Penemuan spesies tumbuhan ini pada tahun 1839 dilakukan oleh Pieter Willem Korthals, seorang ahli botani Belanda, yang telah memberikan nama tumbuhan ini sebagai *Stephegyne speciosa* (Eisenman 2015). Setelah beberapa dekad (pada tahun 1897), penamaan dan pengkelasan semula nama yang diterima sekarang sebagai *Mitragyna speciosa* (Korth.) Haviil telah dilakukan oleh George Darby Haviland (Ahmad et al. 2022; Eisenman 2015). Nama lain bagi tumbuhan ini adalah ketum atau dikenali biak-biak di Malaysia, kakuam, gratom, ithang atau thom di Thailand, *giam* di Vietnam, *beinsa* di Myanmar, *mambog*, *lugub* atau *polapupot* di Filipina, dan *kadamba* atau *keton* di Indonesia. Nama biasa iaitu kratom berasal daripada bahasa Sankrit, *kadam* yang dikaitkan dengan spesies *Neolamarckia cadamba* (Roxb) (Eisenman 2015).

Genus *Mitragyna* terdiri daripada sepuluh spesies iaitu enam spesies yang terdapat di benua Asia iaitu *M. speciosa*, *M. diversifolia*, *M. hirsuta*, *M. parvifolia*, *M. rotundifolia* dan *M. tubulosa*, manakala empat spesies di benua Afrika iaitu *M. inermis*, *M. ciliata*, *M. rubrostipulata* dan *M. chevalieri* (Ahmad et al. 2022). Taburan pelbagai spesies *Mitragyna* di Asia bermula dari India sehingga New Guinea dan di Afrika adalah disenaraikan di dalam Jadual 2.1. Taburan tumbuhan *M. speciosa* ini meluas di beberapa kawasan tropika dan subtropika Asia Tenggara termasuklah Malaysia, Indonesia, Thailand, Myanmar, Filipina dan Vietnam. Di Semenanjung Malaysia, taburan tumbuhan ketum adalah tinggi di negeri Kedah, Perlis dan Kelantan disebabkan oleh iklim dan keadaan tanah yang sesuai.

Jadual 2.1 Taburan spesies-spesies *Mitragyna* di benua Asia dan Afrika

Spesies	Sinonim	Taburan
<b>Asia</b>		
<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Nauclea korthalsii</i> <i>Nauclea luzoniensis</i> <i>Nauclea speciosa</i> <i>Stephegyne speciosa</i>	Indonesia (Borneo, Sumatera, Papua, Papua Barat), Malaysia (Semenanjung, Sabah, Sarawak), Myanmar, New Guinea, Papua New Guinea, Filipina, Thailand, Vietnam.
<i>Mitragyna rotundifolia</i>	<i>Bancales rotundifolius</i> <i>Mitragyna brunonis</i> <i>Nauclea brunonis</i> <i>Nauclea rotundifolia</i>	Bangladesh, China, India, Laos, Myanmar, Thailand
<i>Mitragyna parvifolia</i>	<i>Nauclea parvifolia</i> <i>Stephegyne parvifolia</i>	India, Sri Lanka, Myanmar, Bangladesh
<i>Mitragyna hirsuta</i>	<i>Paradina hirsuta</i>	Kemboja, China, Laos, Myanmar, Thailand, Vietnam
<i>Mitragyna diversifolia</i>	<i>Mitragyna javanica</i> <i>Nauclea diversifolia</i> <i>Nauclea adina</i> <i>Stephegyne diversifolia</i> <i>Stephegyne tubulosa</i>	Kemboja, China, Indonesia, Laos, Malaysia, Myanmar, Filipina, Thailand, Vietnam
<i>Mitragyna tubulosa</i>	<i>Nauclea tubulosa</i>	Endemik sehingga Semenanjung India
<b>Afrika</b>		
<i>Mitragyna ciliata</i>	<i>Fleroya iedermannii</i> <i>Adina iedermannii</i> <i>Hallea ciliata</i> <i>Hallea Iedermannii</i>	Timur Liberia sehingga bahagian tengah Republik Afrika dan dari selatan sehingga ke Gabon, Republik Demokratik Congo dan Angola
<i>Mitragyna rubrostipulata</i>	<i>Fleroya rubrostipulata</i> <i>Adina rubrostipulata</i> <i>Hallea rubrostipulata</i>	Republik Demokratik Congo, Etiopia, Kenya, Tanzania, Malawi, Mozambique
<i>Mitragyna chevalieri</i>	<i>Adina stipulosa</i> <i>Hallea stipulosa</i> <i>Fleroya stipulosa</i> <i>Nauclea stipulosa</i>	Afrika: Meluas dari timur Senegal sehingga ke Uganda dan dari selatan sehingga ke Zambia dan Angola
<i>Mitragyna inermis</i>	<i>Adina inermis</i> <i>Nauclea inermis</i> <i>Uncaria inermis</i> <i>Nauclea africana</i> <i>Mitragyna africana</i>	Timur Mauritania sehingga ke Sudan

### 2.1.1 Morfologi dan habitat tumbuhan ketum

Pokok ketum mempunyai batang menegak yang boleh tumbuh sehingga mencapai ketinggian 25 meter dan lebarnya adalah 0.6–0.9 meter (Rajah 2.1). Pokok ini mempunyai batang lurus dan akar pokok ini adalah berakar tunjang. Batang pokok ini mempunyai kulit luar yang licin dan berwarna kelabu, serta kulit dalam pula berwarna merah jambu (Eisenman 2015). Daun-daun ketum berwarna hijau tua dan berbentuk *ovate-accuminate* dengan susunan bersilang (Grundmann, Hendrickson & Greenberg 2022). Daun ketum berukuran di antara 14–20 cm panjang dan 7–12 cm lebar dengan 12–17 pasang urat daun. Terdapat beberapa jenis ketum yang telah dikenalpasti berdasarkan warna urat daun iaitu urat daun berwarna hijau, putih, kuning dan merah (Boffa et al. 2018).



Rajah 2.1 Tumbuhan *M. speciosa* (ketum)

Sumber : Grundmann, Hendrickson dan Greenberg 2022

Bunga ketum adalah berwarna kuning dan tumbuh di hujung dahan dengan berjambak. Bunga ini mengandungi lebih kurang 120 kelopak bagi setiap satu tangkai dan benihnya bersayap (Eisenman 2015). Seperti bunga lain, bunga ketum juga mempunyai aroma yang boleh menarik perhatian serangga seperti lebah, rama-rama dan kumbang untuk penyebaran debunga (Brown, Lund & Murch 2017). Jumlah buah setangkai adalah di antara lima sehingga lapan biji, di mana buah ketum muda berwarna hijau, sementara

buahnya yang tua berwarna coklat kehitaman. Selain itu, pembiakan tumbuhan ini bukan sahaja melalui penyebaran biji benih oleh angin, tetapi juga perambatan melalui keratan batangnya (Brown, Lund & Murch 2017; Eisenman 2015).

Penuaian tumbuhan ini dilakukan pertama kalinya apabila tumbuhan ini berumur enam bulan dengan purata ketinggian mencapai lebih kurang satu meter. Penuaian ini dilakukan dengan memetik daun tua dan meninggalkan pucuk serta beberapa daun muda. Penuaian seterusnya dilakukan kira-kira satu sehingga tiga bulan selepas penuaian pertama dan keadaan kesuburan tanah mempengaruhi hasil penuaian tumbuhan ini (Ahmad et al. 2022). Habitat yang sesuai untuk tumbuhan ini adalah tanah subur yang lembap, terdedah dengan cahaya matahari dan terlindung dari angin kuat (Hassan et al. 2013). Pada musim panas, daunnya akan berguguran sedikit, namun menjadi lebat semula pada musim hujan. Keperluan ekologi dan habitat *Mitragyna* adalah berbeza mengikut spesies, contohnya *M. speciosa* boleh dijumpai tumbuh di hutan tropika, berhampiran laluan air, hutan paya dan tanah rawa (Brown, Lund & Murch 2017). Maka, tidak hairanlah jika spesies *Mitragyna* lain mempunyai taburan di kawasan gersang seperti padang pasir. Tahap kesuburan tanah bagi ketum mempunyai kesan terhadap komposisi metabolit sekunder terutamanya kandungan alkaloid dalam daun tumbuhan ini (Zhang et al. 2020).

### **2.1.2 Penggunaan ketum dalam bidang perubatan**

Tumbuhan ketum adalah sumber semulajadi yang kaya dengan nilai terapeutik dan telah banyak memberi manfaat kepada pengguna. Justeru itu, terdapat sebilangan penduduk tempatan menggunakan daun dan tangkai kecil ketum ini sebagai ubatan tradisional. Ekstrak daun ketum ini juga mempunyai pelbagai bioaktiviti yang boleh menyumbang kepada bidang perubatan. Menariknya, kesan psikoaktif ketum ini juga telah dimanfaatkan untuk rawatan ketagihan opioid.

#### **a. Kegunaan perubatan tradisional**

Ketum telah digunakan secara meluas sebagai ubat tradisional oleh penduduk tempatan bagi merawat sakit otot, cirit-birit, batuk, darah tinggi, kencing manis dan mengurangkan

gejala demam (Grundmann, Hendrickson & Greenberg 2022; Meireles et al. 2019). Kebiasaannya, pekerja buruh, penoreh getah, petani mahupun nelayan di Malaysia dan Thailand menggunakan ketum untuk mengurangkan keletihan dan meningkatkan tenaga ketika bekerja di bawah panas mentari terik (Halpenny 2017). Penggunaan ketum oleh kalangan wanita tidak diterima secara sosial, tetapi kalangan lelaki menggunakannya sebagai agen afrodisiak, bahan perangsang, penghilang rasa sakit dan pengganti alkohol tanpa stigma penyalahgunaan di Asia Tenggara (Grundmann, Hendrickson & Greenberg 2022). Disebabkan kesan analgesiknya, ia juga digunakan untuk menuam luka dan sebagai anestetik tempatan secara tradisional (Cinosi et al. 2015).

Selain itu, tumbuhan herba psikoaktif ini juga digunakan sebagai bahan rekreasi untuk mencapai euforia dan ketenangan (Karunakaran et al. 2022). Manakala, ketum juga digunakan sebagai pengganti opium dan pengintoksikasi bagi penagih morfin (Eisenman 2015). Sejak beberapa dekad lalu, daun tumbuhan ini menarik perhatian penyelidik menggunakan bahan semulajadi untuk mengurangkan kesakitan dan sebagai antidepresan. Ia juga digunakan untuk mengurangkan kesan ketagihan berkaitan candu dan penggunaannya secara meluas di Malaysia dan Thailand pada akhir 1800-an sehingga 1920-an (Brown, Lund & Murch 2017). Sehingga kini, pengambilan ketum masih popular dikalangan komuniti Asia Tenggara semasa majlis keramaian di kampung. Menariknya penggunaan ketum telah menyebar ke Barat khususnya di Amerika Syarikat dan produk-produk ketum dipasarkan secara meluas dalam talian (Williams & Nikitin 2020). Antara sebab penggunaan ketum ini adalah untuk rawatan sendiri penyakit akut dan kronik, sindrom sarak opioid dan masalah mental seperti kebimbangan, kemurungan dan tekanan (Garcia-Romeu et. 2020; Grundmann 2017; Smith & Lawson 2017).

#### **b. Aktiviti farmakologi ekstrak ketum**

Kajian literatur menunjukkan bahawa ekstrak daun *M. speciosa* mempunyai bioaktiviti antinosiseptif, analgesik, antidepresan, ansiolitik, antimikrob, anti-oksidatif, anti-keradangan, sifat relaksan otot, antidiabetik, antihipertensif dan antipiretik. Keberkesanan ekstrak daun ketum sebagai agen analgesik dan antinosiseptif yang berpotensi telah

dibuktikan melalui pelbagai kajian praklinikal. Antaranya, kesan kependaman nosiseptif berpanjangan diperhatikan pada ujian tindak balas kesakitan terhadap rodent (*hot plate* dan *tail flick*) setelah pemberian ekstrak metanol ketum secara oral (Reanmongkol, Keawpradub & Sawangjaroen 2007). Kesan yang sama juga diperhatikan daripada pelbagai ekstrak ketum (alkaloid, metanol, akues) yang menggunakan ujian yang sama (Sabetghadam, Ramanathan & Mansor 2010). Melalui pemberian intraperitonium, ekstrak metanol ketum menunjukkan kesan antinosiseptif yang baik dengan mengurangkan tindak balas *writhing* dan sensasi kesakitan pada model mencit (Shaik Mossadeq et al. 2009). Namun begitu, ekstrak metanol ketum yang diperoleh menggunakan kaedah moden yang dikenali *accelerated solvent extraction* (ASE) menunjukkan kesan antinosiseptif yang lebih baik berbanding ekstrak metanol dan etil asetat ketum (Goh et al. 2021). Dapatan kajian ini menjelaskan bahawa ekstrak daun ketum mempunyai aktiviti analgesik yang berpotensi dalam pengurusan kesakitan.

Selain itu, kajian terhadap manusia menunjukkan pengambilan ketum yang tinggi (>3 gelas sehari atau bersamaan 72.5–74.9 mg bagi dos MTG) tidak mengganggu fungsi motor, ingatan, perhatian, atau fungsi eksekutif pada pengguna ketum (Singh et al. 2018). Sebatian utama ketum, MTG memberikan kesan antidepresan dengan kemampuannya untuk mengurangkan paras kortikosteron mencit dalam ujian *forced swim test* (FST) dan *tail suspension test* (TST) pada dos 10 dan 30 mg/kg (Farah Idayu et al. 2011). Pemberian ekstrak ketum menunjukkan pengurangan kemurungan dan juga menyebabkan penurunan paras glukosa darah pada model tikus diabetes (Chen, Fei & Olatunji 2022). Peningkatan pengawalaturan pengangkut glukosa 1 (GLUT1) dalam sel otot setelah pemberian ekstrak air ketum juga menunjukkan potensi antidiabetiknya (Purintrapiban et al. 2011). Selanjutnya, beberapa kajian terhadap aktiviti antimikrob menunjukkan ekstrak ketum mempunyai kesan perencatan yang luas terhadap bakteria *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Streptococcus pneumoniae* (Parthasarathy et al. 2009; Salim et al. 2021). Manakala, ekstrak daun ketum yang difermentasi menunjukkan aktiviti antibakteria dan aktiviti antibiofilm yang baik terhadap pelbagai patogen (Sornsenee, Chimplee & Romyasamit 2023). Ini mencadangkan kemungkinan kesan peransang ketum menyumbang kepada kesan antidepresan, antimikrob dan antidiabetik.

Di samping itu, ekstrak air ketum pada dos 100 mg/kg meningkatkan aktiviti spesifik *glutathione-S transferase* (GSTs) sebanyak 129% berbanding kawalan (Azizi et al. 2010), dan ini menunjukkan potensinya sebagai agen antioksidatif. Berdasarkan ujian penjerapan radikal bebas, ekstrak daun ketum juga menunjukkan aktiviti antioksidatif yang sangat kuat, di mana ekstrak metanol dan etanol menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> DPPH masing-masing sebanyak 37.08 µg/mL dan 38.56 µg/mL (Parthasarathy et al. 2009; Yuniarti et al. 2020). Tambahan juga, ketum dilaporkan mempunyai kesan anti-keradangan dengan menghalang pengekspresan pengantara pro-radang seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 (Sornsenee, Chimplee & Romyasamit 2023). Hasil pemerhatian ujian anti-radang pada model rodent menunjukkan bahawa ekstrak metanol ketum (200 mg/kg) menyebabkan pengurangan edema, pembentukan tisu granulomatous secara ketara, serta mengekalkan ketebalan kulit semasa proses keradangan (Salim et al. 2022; Shaik Mossadeq et al. 2009). Oleh demikian, ini menjelaskan potensi ekstrak ketum sebagai agen anti-oksidadif dan anti-keradangan melalui penghambatan radikal bebas dan pengurangan keradangan.

Dalam kajian Chittrakarn et al. (2010), kesan relaksan otot diselidik pada tikus Wistar menggunakan ekstrak metanol ketum, yang menyebabkan sekatan konduksi saraf dan mengurangkan amplitud serta tempoh isyarat saraf. Ekstrak metanol ketum juga menurunkan tekanan darah diastolik dan meningkatkan pengawalaturan trigliserida dan kolesterol dalam tikus albino jantan yang menunjukkan potensi antihipertensi (Harizal et al. 2010). Semua dos perlakuan ketum (10, 30 dan 100 mg/kg) menunjukkan bahawa ekstrak tumbuhan ini mengaruhi kesan sedatif dan mempengaruhi kesan ansiolitik pada mencit (Moklas et al. 2013). Meskipun kajian literatur mendapati ekstrak ketum sebagai agen ansiolitik yang boleh digunakan untuk merawat keresahan, namun pada dos yang tinggi ia boleh menjejaskan fungsi kognitif dan motor (Chen, Fei & Olatunji 2022). Selain itu, pemberian akut ekstrak ketum kepada tikus mengurangkan pengambilan makanan dan air, yang akhirnya membawa kepada kesan anorektik (Kumarnsit et al. 2021). Oleh itu, penelitian lebih lanjut tentang penggunaan ekstrak ketum bagi tujuan terapeutik amat digalakkan untuk memahami lebih terperinci manfaat dan risikonya.

### c. Penggunaan ketum dalam rawatan ketagihan opioid

Penggunaan ketum tidak memerlukan preskripsi perubatan di kebanyakan negara dan harga pasarnya yang murah menyebabkan ia digunakan sebagai alternatif kepada candu (Meireles et al. 2019). Ekstrak mentah ketum boleh mengurangkan sindrom sarak dan sering digunakan untuk rawatan sendiri bagi ketagihan opioid (Yusoff et al. 2016). Sindrom sarak merupakan simptom yang ditunjukkan oleh penagih apabila berhenti daripada pengambilan dadah opioid dalam masa tertentu. Antaranya adalah sakit otot, penurunan berat badan, demam, insomnia, kegelisahan, hidung berair, mata berair, muntah, sakit kepala, kelesuan, cirit-birit, tremor dan berpeluh (Halpenny 2017; Singh, Müller & Vicknasingam 2014). Walau bagaimanapun, sindrom sarak bagi pengguna ketum adalah ringan berbanding pengguna opioid (Henningfield, Fant & Wang 2018). Selain itu, risiko penyalahgunaan ekstrak ketum yang rendah menunjukkan potensinya untuk melemahkan pengekspresan teraruh-morfin dan mengurangkan sindrom sarak. Dapatan ini sekaligus menyokong penggunaan ketum dalam rawatan sendiri bagi ketagihan opioid (Meepong & Sooksawate 2019).

Secara amnya, kesan ketum pada manusia bergantung kepada dos, dos kecil menghasilkan ransangan seperti kokain, sedangkan dos yang lebih besar menyebabkan kesan sedatif-narkotik seperti morfin (Prozialeck, Jivan & Andurkar 2012). Pengguna ketum boleh dijangkakan mengalami kesan sepenuhnya dalam anggaran masa di antara 30–60 minit selepas pengambilan, manakala kesan awal boleh berlaku dalam jangka masa kira-kira 10–20 minit (Henningfield, Fant & Wang 2018). Di antara enam spesies *Mitragyna* Asia dan empat di Afrika yang telah diketahui, hanya *M. speciosa* yang mempamerkan kesan ini (Warner, Kaufman & Grundmann 2016). Penggunaan ketum pada dos rendah (sekitar 1–5 g) mengaruh kesan ransangan ringan, yang biasanya digunakan untuk mengurangkan keletihan, meningkatkan kecergasan dan meningkatkan nafsu seksual (Henningfield, Fant & Wang 2018). Manakala, penggunaan ketum pada dos sederhana (5–15 g) adalah bersesuaian digunakan untuk rawatan ketagihan opioid. Namun, penggunaan ketum pada dos tinggi (16–25 g), yang dianggap terlalu kuat bagi pengguna boleh membawa kepada kelesuan, peluh berlebihan, cirit-birit, mual dan disforia. Kesan jangka

panjang penggunaan ketum dos tinggi juga dikaitkan dengan anoreksia, kehilangan berat badan, terketar-ketar, konvulsi dan gejala psikosis (Warner, Kaufman & Grundmann 2016).

Penggunaan herba ini dalam jangka masa panjang menyebabkan toleransi dan kebergantungan, sementara pemberhentian pengambilan herba ini menyebabkan sindrom sarak (Singh, Müller & Vicknasingam 2014). Terdapat juga penggunaan serentak ketum bersama dengan bahan lain seperti carisprodol, modafinil, propilheksedrina, fentanil, difenhidramina, temazepam, venlafaxine, O-desmetilltramadol dan morfin yang telah terbukti menyebabkan interaksi ubat yang tidak baik, risiko kesihatan yang serius dan bahkan kematian (Brogdon et al. 2022; Holler et al. 2011; Kapp et al. 2011; Kronstrand et al. 2011; Pantano et al. 2012). Punca penyebabnya masih belum dikenalpasti dan difahami dengan jelas disebabkan kekurangan maklumat farmakologi sebatian bioaktif ketum serta terbitannya (Trakulsrichai et al. 2015). Oleh sebab potensi penyalahgunaannya, *M. speciosa* dan penyediaannya telah diletakkan dibawah Akta Racun 1952 sejak 2003 di Malaysia (Prozialeck et al. 2019; Vicknasingam et al. 2010). Ini bermaksud bahawa penjualan *M. speciosa* dan penyediaannya adalah kesalahan dan boleh dikenakan denda atau hukuman penjara.

### 2.1.3 Sebatian-sebatian alkaloid ketum

Kesan sedatif opioid dan psikoaktif bagi setiap strain *M. speciosa* dikaitkan dengan kandungan sebatian fitokimia dalam daunnya. Pemencilan dan pengenalpastian sebatian fitokimia ketum bermula seawal tahun 1960-an. Sejak itu, lebih daripada 58 sebatian alkaloid serta beberapa metabolit sekunder (flavanoid, terpenoid, saponin, polifenol, monoterpena, secoirrioid dan glikosida) telah dipencil dan dikenalpasti daripada tumbuhan ini (Veeramohan et al. 2023). Anggaran komposisi alkaloid yang terkandung di dalam daun segar ketum adalah kira-kira 0.5–1.5% berdasarkan jisim (Hassan et al. 2013).

Daun ketum muda dari Thailand menunjukkan kehadiran MTG sebagai alkaloid utama (66%), serta beberapa analognya iaitu painantein (9%), spesioginin (7%) dan spesiosiliatin (1%) (Orio et al. 2012). Sebatian terbitan MTG, iaitu 7-hidroksimitraginin (7-

OH-MTG) hadir dalam kepekatan yang jauh lebih rendah, iaitu  $<0.01\%$  daripada jumlah keseluruhan alkaloid dalam sampel segar dan sehingga  $2\%$  dalam produk komersial (Berthold et al. 2022; Ponglux et al. 1994). Kandungan MTG dalam daun ketum dari Malaysia ialah sekitar  $12\%$ , adalah lebih rendah berbanding dari Thailand (Takayama 2004). Manakala, kajian terkini menunjukkan bahawa MTG mempunyai  $0.7\text{--}38.7\%$  daripada jumlah kandungan alkaloid dalam produk komersial dan penyediaan tradisional (Berthold et al. 2022). Perbezaan kandungan MTG ini dipengaruhi oleh beberapa faktor termasuklah jenis, kemotaip, umur tanaman, geografi, iklim dan musim penuaian (Chear et al. 2021; León et al. 2009). Sebagai contoh, kepekatan MTG boleh meningkat 2.5 kali ganda dalam tempoh dua minggu selepas pokok ketum dipindahkan ke persekitaran pencahayaan dan suhu tinggi (Pearson et al. 2020). Daun ketum tua juga menunjukkan peratusan kandungan MTG yang lebih tinggi berbanding daun ketum muda (León et al. 2009). Kajian lain pula mendapati ketum Malay hijau dari Malaysia mempunyai kandungan MTG yang paling tinggi ( $59.7\%$ ), diikuti Borneo putih dari Borneo ( $48.2\%$ ), Thai merah dari Thailand ( $44\%$ ), Bali merah dari Bali ( $37.7\%$ ) dan Malay merah dari Malaysia ( $4\%$ ) (Boffa et al. 2018).

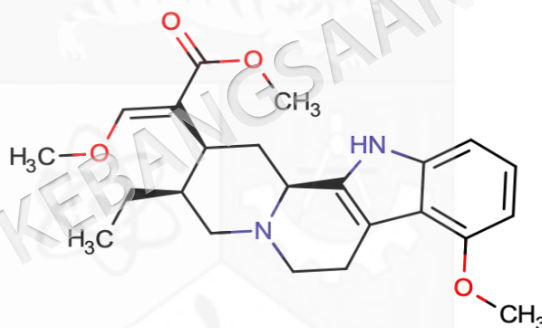
Selain itu, ekstrak metanol ketum juga memperolehi sebatian-sebatian alkaloid yang sama serta sebatian alkaloid minor lainnya, termasuklah mitraginalin, pinoselin, mitralaktonal, mitrasulginin dan 3,4,5,6-tetradehidromitraginin (Takayama et al. 1998). Manakala, terdapat 9 sebatian alkaloid korinant (MTG, spesioginin, spesiosiliatin, painantein, 7-OH-MTG, mitraginalin, korinanteidalin, korinanteidin dan isokorinoxein) dan 2 jujuk minor (9-metoksimitralaktonin dan mitralaktonin) yang telah dipencilkan menggunakan pelarut etil asetat (Takayama et al. 2004). Terdapat juga empat jenis alkaloid baru yang diperolehi daripada pengekstrakan daun ketum Malaysia iaitu mitraginalin, korinanteidalin, asid mitraginalik dan asid korinanteidalinik (Houghton Latiff & Said 1991). Pemencilan dan pengenalpastian alkaloid dalam buah ketum telah menunjukkan kehadiran 7-hidroksispesiosiliatin (Kitajima et al. 2006).

Daripada keseluruhan sebatian ketum yang diterangkan, MTG dan 7-OH-MTG adalah sebatian yang paling lazim dilaporkan mempunyai kesan pada reseptor opioid dan

bukan opioid (Hossain et al. 2023). Maka, MTG yang merupakan alkaloid utama ketum dan sebatian terbitannya, 7-OH-MTG merupakan bahan psikoaktif yang paling poten telah dipilih dalam kajian ini.

## 2.2 MITRAGININ

Mitraginin (MTG) ( $C_{23}H_{30}N_2O_4$ ,  $398.503 \text{ g mol}^{-1}$ ) atau 9-metoksi-korinanteidina, merupakan alkaloid indol utama *M. spesiosa* dengan komposisi sebanyak 66% daripada keseluruhan kandungan alkaloid daun ketum. Struktur kimia MTG seperti yang ditunjukkan di dalam Rajah 2.2, adalah sejenis alkaloid yang tergolong dalam kumpulan monoterpena indol. Struktur ini mengandungi gelang aromatik yang menyangkut pada dua cincin piperidin yang menyumbang kepada sifat kimia dan farmakologi sebatian ini.



Rajah 2.2 Struktur kimia 2D bagi MTG. Struktur MTG telah dilukis menggunakan perisian Marvin Sketch dan Chimera

Alkaloid korinant terbahagi kepada empat kumpulan (normal, pseudo, allo dan epi-allo) berdasarkan struktur kimia. MTG dikelaskan dalam kumpulan allo dan struktur MTG didapati hampir sama dengan struktur yohimbe iaitu alkaloid karbolina daripada *Corynanthe yohimbe* dan voacangine iaitu alkaloid utama akar kulit pokok *Voacanga africana* (Henningfield, Fant & Wang 2018). Diastereoisomer MTG seperti spesiosiliatin, spesioginin dan mitraciliatin yang mempunyai struktur teras tetrasiklik alkaloid indol turut dijumpai pada daun ketum (Hossain et al. 2023). MTG dikategorikan sebagai asid labil

yang larut dalam larutan organik seperti alkohol, kloroform dan asid asetik, namun mempunyai keterlarutan yang lemah dalam air dan larutan alkali (Ramanathan et al. 2015).

### 2.2.1 Sifat farmakologi MTG

Kesan farmakologi MTG telah dihuraikan dalam beberapa kajian lepas yang merangkumi kesan anksiolitik pada tikus dengan mengurangkan kebimbangan dan mengalakkan ketenangan (Hazim et al. 2014), mengurangkan sindrom sarak bagi ketagihan opioid (Boyer et al. 2008), serta kesan anti-radang melalui perencatan pengekspresan mRNA COX-2 dan penghasilan prostaglandin E2 (Utar et al. 2011). MTG juga berpotensi sebagai agen antidepresan dengan memodulasi sistem saraf dengan mengurangkan tahap kortikosteron pada tikus (Farah Idayu et al. 2011). Walau bagaimanapun, pemberian kronik MTG pada model tikus telah menunjukkan ketidakmampuan kognitif, secara tidak langsung menerangkan potensi penyalahgunaan dan ketagihan MTG (Yusoff et al. 2016). Kajian lain menunjukkan bahawa MTG pada dos rendah (1–10 mg/kg) adalah selamat, namun dos tinggi (100 mg/kg) menunjukkan ketoksikan yang mendorong kepada perubahan hispatologi hati, buah pingang dan otak serta perubahan hematologi dan biokimia (Sabetghadam, Navaratnam & Mansor 2013). MTG juga didapati menunjukkan kesan ketoksikan perkembangan embrio pada kepekatan tinggi, mencadangkan potensi risiko teratogenik semasa kehamilan (Damodaran et al. 2021). MTG menunjukkan kesan perencatan yang sederhana terhadap sel kanser hati dengan  $IC_{50}$  sebanyak  $42.11 \pm 1.31 \mu\text{M}$  (Karunakaran et al. 2024). Kesan farmakologi MTG dipercayai melibatkan reseptor opioid  $\mu$  (MOR),  $\delta$  (DOR) dan  $\kappa$  (KOR), serta reseptor bukan opioid (serotonin, dopamina, adenosina dan adrenergik) (Prozialeck, Jivan & Andurkar 2012; Warner, Kaufman & Grundmann 2016).

Sebatian MTG terbukti mempamerkan aktiviti pada reseptor opioid supraspinal, yang menghasilkan kesan analgesik dalam kajian *in vivo* dan *in vitro*. Misalnya, MTG menunjukkan keafinan tertinggi pada MOR ( $K_i = 0.709\text{--}0.740 \mu\text{M}$ ), yang diikuti KOR ( $K_i = 1.3\text{--}1.7 \mu\text{M}$ ) dan DOR ( $K_i = 6.5\text{--}6.8 \mu\text{M}$ ) (Ellis et al. 2020; Obeng et al. 2021). Kesan analgesik MTG adalah 13 kali lebih poten daripada morfin, tetapi 4 kali kurang poten

daripada 7-OH-MTG (Schifano et al. 2015). MTG juga bertindak sebagai agonis MOR yang memudahkan penghantaran impuls saraf merentasi neuron. Ia juga bertindak sebagai antagonis kompetitif DOR dan KOR yang menghalang penghantaran impuls saraf merentasi neuron (Kruegel et al. 2016; Váradi et al. 2016). Aktiviti farmakologi terhadap MOR memberi kesan analgesia, euforia dan mempengaruhi pernafasan, manakala aktiviti antinosisseptif MTG diperantara oleh DOR (Lynch et al. 2023; Meireles et al. 2019). Interaksinya dengan reseptor opioid mencadangkan perencatan pelepasan neurotransmitter akibat daripada saluran kalsium neuron ( $\text{Ca}^{2+}$ ) yang terhalang (Matsumoto et al. 2005). Selain itu, tindakan agonis MOR oleh MTG yang dipengaruhi oleh isyarat G protein tidak melibatkan tapak jalan  $\beta$ -arrestin (Kruegel et al. 2016). Oleh itu, penyahaktifan  $\beta$ -arrestin mencadangkan MTG sebagai templat dadah yang berguna untuk pembangunan opioid terbaru dengan kesan sampingan yang minimum dan selamat.

Aktiviti farmakologi MTG turut melibatkan reseptor bukan opioid sistem saraf pusat termasuklah reseptor serotonin, dopamina, adenosina dan adrenergik yang dianggap menjadi penyumbang kepada aktiviti analgesik. MTG mengikat pada reseptor adrenergik dengan afiniti tinggi pada reseptor  $\alpha$ -1A ( $K_i = 1.34 \mu\text{M}$ ) dan afiniti rendah pada reseptor  $\alpha$ -2A (nilai  $K_i = 4.72 \mu\text{M}$ ) dan  $\alpha$ -2B ( $K_i = 9.29 \mu\text{M}$ ) (Obeng et al. 2020). Dalam kajian lain, nilai  $K_i$  kepada reseptor adrenergik  $\alpha$ -2A adalah sebanyak 2300 nM dan kepada reseptor adrenergik  $\alpha$ -2B adalah sebanyak 4.9  $\mu\text{M}$  (Ellis et al. 2020). Selanjutnya, nilai  $K_i$  bagi MTG pada reseptor serotonin 5-HT2A ialah 7.3  $\mu\text{M}$  dan 5-HT1A ialah 5.8  $\mu\text{M}$  menggunakan asai pengikatan radioligan (Ellis et al. 2020). Hasil kajian yang dilakukan oleh León et al. (2021) menunjukkan MTG mempamerkan keafinan rendah pada kedua-dua reseptor serotonin 5-HT1A ( $K_i = 5.88 \mu\text{M}$ ) dan 5-HT2B ( $K_i = 1.26 \mu\text{M}$ ) berbanding spesioginin ( $K_i = 0.54 \mu\text{M}$ ). Pengaktifan reseptor 5-HT1A terlibat dalam kesan ansiolitik dan antidepresan, manakala modulasi reseptor 5-HT2B boleh membawa kepada aktiviti kardiovaskular yang tidak normal dan kerosakan hati (León et al. 2021). Selain itu, MTG didapati menghalang pengikatan radioligan pada reseptor dopamin  $\text{D}_2$  dengan sederhana, iaitu sebanyak 54.22% (Boyer et al. 2008). Kesan ansiolitik MTG mungkin disebabkan oleh interaksinya dengan reseptor GABAergik dan dopaminergik di bahagian otak yang mengawal tahap keresahan (Hazim et al. 2014; Yusoff et al. 2016).

Secara ringkas, sebatian MTG menunjukkan profil keafinan yang kompleks terhadap pelbagai jenis reseptor opioid dan bukan opioid dalam sistem saraf pusat manusia. Aktiviti MTG pada reseptor reseptor opioid dan adrenergik menghasilkan kesan analgesik pada sistem kardiovaskular dan sistem saraf pusat manusia. Sementara, interaksinya dengan reseptor serotonin dan dopamin menyebabkan kesan anksiolitik dan antidepresan. Penemuan ini menandakan potensi MTG sebagai agen terapeutik yang komprehensif dalam merawat kesakitan dan gangguan neuropsikiatri.

### 2.2.2 Profil farmakokinetik MTG

Profil farmakokinetik MTG melibatkan penyerapan melalui saluran pencernaan, pendedaran dalam darah, metabolisme di hati dan penyingkiran melalui air kencing dan najis. Kajian *in vitro* berkaitan ketelapan MTG merentasi monolapisan sel Caco-2 dan sel MDR-MDCK yang sederhana tanpa efluks yang tinggi mencadangkan bahawa penyerapan usus dan penembusan rintangan darah otak (BBB) bagi MTG adalah melalui pengangkutan pasif (Manda et al. 2014). Keputusan ini disokong oleh laporan oleh Kong et al. (2017a), di mana MTG menunjukkan kebolehtelapan yang baik melintasi BBB selepas suntikan intravena. Kajian Jagabalan et al. (2018) menunjukkan kebolehtelapan MTG ke epitelium usus adalah sebanding dengan propranolol. MTG juga menunjukkan penyerapan tisu otak yang 18 kali lebih tinggi daripada 7-OH-MTG dan ini menjelaskan kecenderungan MTG untuk bertumpuk dalam sel parenkim otak berbanding 7-OH-MTG (Yusof et al. 2019). Hasil kajian Kruegel et al. (2019) juga menunjukkan penetrasi MTG ke otak adalah sangat tinggi (~1:1 otak:plasma). Penyingkiran sebatian MTG daripada badan manusia adalah menerusi air kencing, dimana ia mengalami proses metabolisme di hati sebelum disingkirkan (Prozialeck, Jivan & Andurkar 2012).

Pengikatan protein plasma manusia dengan MTG adalah dianggarkan 95–97% yang diperoleh menggunakan dialisis keseimbangan, menunjukkan keafinan pengikatan yang tinggi (Manda et al. 2014; Obeng et al. 2020). Manakala, penentuan menggunakan ultrapenurasan mendapati lebih kurang 85% MTG pada kepekatan 10  $\mu\text{M}$  mengikat pada protein plasma manusia selepas 1 jam pada 37 °C (Kong et al. 2017b). Keafinan pengikatan yang tinggi yang diwakili oleh fraksi bebas yang rendah menunjukkan pengikatan protein

plasma dengan MTG pada manusia ( $f_u$  MTG= 0.02) adalah lebih kuat berbanding pada tikus ( $f_u$  MTG = 0.205–0.307) (Obeng et al. 2020; Yusof et al. 2019). Pengikatan MTG yang tinggi dengan protein plasma mempengaruhi kestabilannya dan menjelaskan panjang separuh hayat dan isipadu distribusinya.

Kajian lepas menunjukkan MTG adalah lebih stabil dalam cecair usus buatan (pH 6.8) berbanding cecair gastrik buatan (pH 1.2), dengan degradasi sebanyak 25–26% selepas 1–2 jam inkubasi pada suhu 37 °C (Manda et al. 2014; Ramanathan et al. 2015). Selain itu, kestabilan MTG juga bergantung kepada suhu (Basiliere & Kerrigan 2020). MTG stabil selama 8 jam pada suhu di bawah 40 °C dan stabil pada pH sederhana (pH 4 dan pH 6) di bawah suhu lebih tinggi. Di bawah keadaan alkali, MTG mengalami hidrolisis kimia ester metil untuk membentuk 16-karboksimitraginin (Basiliere & Kerrigan 2020). Oleh itu, MTG dianggap sebagai asid labil kerana mempamerkan ketidakstabilan kimia dalam keadaan alkali. Kajian oleh Parthasarathy et al. (2010) mendapati MTG stabil dalam plasma pada suhu –20 °C selama sebulan dan pada suhu bilik sekurang-kurangnya 2 hari. Kajian *in vivo* terhadap tikus menunjukkan separuh hayat MTG selepas pemberian oral adalah antara 3.9–9.4 jam, dengan kadar pembersihan berjulat antara 1.6 hingga 7.0 L/jam/kg (De Moraes et al. 2009; Janchawee et al. 2007; Parthasarathy et al. 2010). Manakala, pemberian oral teh ketum pada manusia mendapati separuh hayat MTG adalah  $23 \pm 16$  jam dan kadar pembersihan adalah  $98 \pm 51$  L/jam/kg (Trakulsrichai et al. 2015), menunjukkan perbezaan penting antara haiwan dan manusia.

Enzim sitokrom P450 (CYP) dan pengangkut efluks seperti P-glikoprotein (P-gp) memainkan peranan dalam metabolisme dan distribusi pelbagai ubat dalam badan. Kesan MTG terhadap enzim metabolik termasuklah CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6 dan CYP2C9 telah dikaji (Hanapi, Ismail & Mansor 2013; Lim et al. 2013; Manda et al. 2017). Beberapa kajian *in vitro* menunjukkan perencatan CYP2D6 oleh MTG adalah kuat dengan nilai  $K_i$  di antara 1.1 hingga 13  $\mu$ M (Hanapi, Ismail & Mansor 2013; Kamble et al. 2020a; Tanna et al. 2021; Todd et al. 2020). MTG pada 100  $\mu$ M merencat lebih kurang 80% aktiviti enzim CYP2C9, CYP2D6 dan CYP3A (Todd et al. 2020) dan juga dicadangkan sebagai perencat kompetitif bagi CYP3A4 dengan nilai  $K_i$  sebanyak 379.18  $\mu$ M (Hanapi, Ismail & Mansor

2013). MTG merencat tindak balas O-deetilasi phenacetin substrat CYP1A2 dengan nilai  $K_i$  lebih besar daripada kepekatan yang boleh diperolehi dalam plasma manusia (Kamble et al. 2020a). Kesan MTG terhadap enzim metabolisme dadah lain (N-demetilase, glutathione S-transferase dan uridin 5'-difosfo-glukuronosiltransferase (UGT)) adalah lemah dan memerlukan kepekatan tinggi (Anwar, Ismail & Mansor 2012; Haron & Ismail 2015; Ya et al. 2019). Kajian mendapati MTG boleh merencat P-glikoprotein (P-gp), yang berpotensi menyebabkan interaksi dadah apabila MTG diberikan bersama ubat-ubatan substrat P-gp (Manda et al. 2014; Manda et al. 2017; Meyer et al. 2015). P-gp berfungsi untuk mengepam keluar xenobiotik dari sel-sel di otak, usus dan hati. Perencatan P-gp boleh menyebabkan peningkatan penyerapan dadah, yang membawa kepada kepentingan terapeutik.

Penilaian profil farmakokinetik MTG selepas pemberian oral dan intervena terhadap haiwan dan manusia adalah diringkaskan dalam Jadual 2.2. Terdapat enam kajian menggunakan model tikus (Avery et al. 2019; De Moraes et al. 2009; Janchawee et al. 2007; Kong et al. 2017a; Parthasarathy et al. 2010; Vuppala et al. 2011) dan satu kajian model anjing *Beagle* mengenai profil farmakokinetik MTG (Maxwell et al. 2020). Terdapat beberapa kajian lepas yang menjelaskan mengenai profil farmakokinetik MTG manusia (Tanna et al. 2022; Trakulsrichai et al. 2015). Trakulsrichai et al. (2015) telah mengkaji profil farmakokinetik manusia yang melibatkan 10 pengguna lelaki sihat di Thailand menggunakan dua dos pemuatan teh ketum (6.25–23 mg/g kandungan MTG) selama 8 hari. Manakala, kajian lain pula menilai profil farmakokinetik satu dos rendah (2 g) produk ketum yang diberikan secara oral kepada enam peserta sihat (Tanna et al. 2022). Disebabkan kajian mengenai data farmakokinetik MTG terhadap haiwan dan manusia adalah terhad, maka ini telah mencipta cabaran dalam mengoptimalkan eksperimen untuk kajian lanjutan. Daripada semua dapatan yang disenaraikan dalam Jadual 2.2, boleh dirumuskan bahawa variasi dalam dos yang digunakan, kaedah pengekstrakan dan cara pengambilan telah menyumbang kepada kepelbagaian data farmakokinetik.

Konklusinya, pemahaman yang lebih baik tentang profil farmakokinetik membantu dalam merancang penggunaan MTG secara lebih efektif dan selamat bagi pesakit. Pemahaman yang mendalam tentang pengangkutan dan pengedaran MTG adalah penting

Jadual 2.2 Parameter farmakokinetik bagi MTG dalam manusia dan haiwan

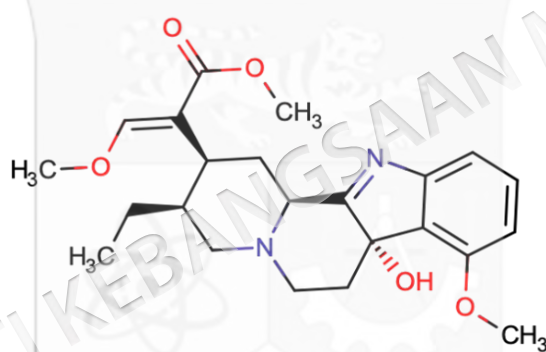
Rujukan	Spesies, Sampel	Dos (mg/kg)	Parameter Farmakokinetik					
			C <sub>max</sub> (µM)	T <sub>max</sub> (jam)	AUC <sub>0-∞</sub> (µM/jam)	V <sub>d</sub> (L/kg)	CL (L/jam/kg)	t <sub>1/2</sub> (jam)
<b>Manusia</b>								
Trakulsrichai et al. 2015	Manusia sihat, plasma	6.25–23 (mg/hari)	0.26	0.83	1.68	38.04	98.10	23.24
Tanna et al. 2022	Manusia sihat, Plasma	19.48 (mg/g)	0.082	1.00	0.42	12 700 (L)	233 (L/jam)	45.3
<b>Pemberian intervena MTG (1.5–5 mg/kg)</b>								
Parthasarathy et al. 2010	Tikus jantan, Plasma	1.5	5.77	1.2	23.09	0.79	0.29	2.90
Vuppala et al. 2011	Tikus jantan, Plasma	5	9.79	1 min	8.53	8.20	1.20	2.60
Kong et al. 2017a	Tikus betina, Plasma terdialis	5	3.81	0.50	11.62	9.84	2.26	13.14
Avery et al. 2019	Tikus jantan, Plasma	5	-	-	4.24	8.00	1.30	6.50
Maxwell et al. 2020	Anjing betina <i>Beagle</i> , Plasma	5	0.29	0.30	-	-	-	8.70
<b>Pemberian oral MTG (20–50 mg/kg)</b>								
Janchawee et al. 2007	Tikus betina, Serum	40	0.63	1.83	-	89.50	1.60	9.43
De Moraes et al. 2009	Tikus betina, Plasma	20	0.42	1.26	-	37.90	6.35	3.85
Parthasarathy et al. 2010	Tikus jantan, Plasma	50	1.76	4.50	20.58	64.00	7.00	6.60

C<sub>max</sub> = kepekatan serum/plasma maksimum, T<sub>max</sub> = masa untuk mencapai kepekatan maksimum, AUC<sub>0-∞</sub> = keluasan dibawah lengkung dari masa sama dengan sifar hingga afiniti, V<sub>d</sub> = isipadu taburan, CL = pembersihan dan t<sub>1/2</sub> = separuh hayat

untuk memaksimumkan keberkesanan terapeutik dan mengurangkan kemungkinan kesan sampingan yang tidak diinginkan.

### 2.3 7-HIDROKSIMITRAGININ

7-hidroksimitraginin (7-OH-MTG) ( $C_{23}H_{30}N_2O_5$ ,  $414.502 \text{ g mol}^{-1}$ ) atau mitraginin hidroksiindolenina, merupakan sebatian teroksida daripada alkaloid utama ketum, MTG. Kandungan 7-OH-MTG adalah sekitar 2% daripada jumlah keseluruhan alkaloid ketum (Ponglux et al. 1994). Struktur kimia 7-OH-MTG seperti yang ditunjukkan di dalam Rajah 2.3, adalah terpenoid indol dan mempunyai kumpulan berfungsi hidroksil pada posisi C7 yang memainkan peranan penting dalam aktiviti biologi 7-OH-MTG (Kruegel et al. 2019).



Rajah 2.3 Struktur kimia 2D bagi 7-OH-MTG. Struktur 7-OH-MTG telah dilukis menggunakan perisian Marvin Sketch dan Chimera

7-OH-MTG adalah lebih larut dalam pelarut organik seperti etanol, kloroform, dan asid asetik berbanding air atau larutan beralkali, maka penggunaan pelarut adalah digalakkan untuk sebatian ini. Kehadiran kumpulan hidroksil pada struktur 7-OH-MTG meningkatkan keberkesanannya sebagai agonis reseptor opioid yang lebih kuat berbanding dengan MTG. Ini telah dibuktikan melalui kajian hubungan struktur-aktiviti (SAR) yang dilakukan oleh Takayama (2004). Meskipun berkepekatan rendah, 7-OH-MTG menunjukkan aktiviti farmakologi yang lebih poten berbanding MTG. Oleh itu, 7-OH-MTG merupakan sasaran terapeutik yang penting untuk memahami secara lebih mendalam farmakologi ketum.

### 2.3.1 Sifat farmakologi 7-OH-MTG

Sebatian 7-OH-MTG telah menjadi tumpuan utama para penyelidik disebabkan oleh kesan analgesik yang kuat dalam sistem saraf pusat, terutamanya melalui tindakan agonis pada MOR. Kehadiran kumpulan hidroksil pada posisi C7 dipercayai dapat meningkatkan potensi farmakologi dalam sistem saraf pusat (Takayama 2004). Menariknya, sebatian 7-OH-MTG merupakan agen analgesik yang berpotensi dalam perkembangan ubat penahan sakit (Spetea & Schmidhammer 2019). Beberapa kajian praklinik menunjukkan bahawa 7-OH-MTG juga merupakan analgesik yang lebih berkesan daripada morfin apabila diberikan secara oral dan subkutin pada tikus (Matsumoto et al. 2005; Matsumoto et al. 2006). Pemberian berulang 7-OH-MTG secara subkutin boleh menyebabkan pergantungan fizikal serta toleransi antinosiseptif dan toleransi silang terhadap tindakan antinosiseptif morfin (Matsumoto et al. 2005). Dalam eksperimen jentik ekor (*tail-flick*) dan plat pemanas (*hot-plate*), Matsumoto et al. (2004) telah mendapati bahawa pemberian 7-OH-MTG (2.5–10 mg/kg) secara oral kepada mencit menyebabkan kesan antinosiseptif yang kuat dan bergantung kepada dos. Namun, kebergantungan terhadap 7-OH-MTG yang meningkatkan ketagihan dan ketoksikan menunjukkan potensi penyalahgunaannya, seperti dilihat dari peningkatan administrasi sendiri morfin dalam model rodent (Hemby et al. 2019). Namun, berbeza dengan MTG yang menunjukkan risiko yang lebih rendah dan selamat berbanding 7-OH-MTG (Hemby et al. 2019; Sabetghadam, Navaratnam & Mansor 2013).

Selain itu, 7-OH-MTG didapati lebih berkesan daripada morfin dan spesiosiliatin dalam asai antinosiseptif pemanasan dan bertindak sebagai agonis penuh reseptor opioid dalam ujian berfungsi *in vitro* (Obeng et al. 2020). Kesan analgesik 7-OH-MTG melalui interaksinya dengan reseptor opioid adalah 13 lebih kuat daripada morfin dan 46 kali lebih kuat daripada MTG (Takayama 2004). Beberapa kajian lain juga menunjukkan keafinan pengikatan 7-OH-MTG (nilai  $K_i = \sim 0.078 \mu\text{M}$ ) pada reseptor MOR adalah sembilan kali ganda lebih tinggi daripada MTG (nilai  $K_i = \sim 0.709 \mu\text{M}$ ) (Hiranita et al. 2020; Obeng et al. 2021). Di antara tiga sub-jenis reseptor opioid, 7-OH-MTG menunjukkan afiniti yang  $\sim 3$  kali lebih tinggi pada MOR berbanding KOR (nilai  $K_i = 0.22 \mu\text{M}$ ) dan DOR (nilai  $K_i =$

0.243  $\mu\text{M}$ ) (Obeng et al. 2021). Kajian oleh Obeng et al. (2020) turut menyokong dapatan ini, dengan mendapati bahawa afiniti pengikatan pada MOR adalah lebih kuat, namun nilai  $K_i$  (7.16 nM) bagi kajian ini lebih rendah daripada kajian oleh Hiranita et al. (2020). Menariknya peratusan maksimum peransangan *guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate* ( $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) bagi 7-OH-MTG ( $<30 \mu\text{M}$ ) pada reseptor MOR adalah 45%. Sebaliknya, MTG ( $<100 \mu\text{M}$ ) tidak menunjukkan peransangan  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  yang ketara (Hiranita et al. 2020).

Tambahan juga, 7-OH-MTG juga menunjukkan selektiviti berfungsi untuk isyarat G-protein selepas pengaktifan reseptor, tanpa penglibatan  $\beta$ -arrestin. Ini dapat mengurangkan kesan yang tidak diingini daripada pengaktifan reseptor opioid oleh 7-OH-MTG seperti sembelit, depresi pernafasan dan pergantungan (Kruegel et al. 2016; Todd et al. 2020). 7-OH-MTG juga dijangka berkemungkinan terlibat dalam tapak jalan serotonergik dan neuron noradrenergik (Matsumoto et al. 2006). Kajian oleh Ellis et al. (2020) mendapati 7-OH-MTG menunjukkan keafinan pengikatan lebih lemah daripada MTG pada reseptor adrenergik ( $\alpha$ -2A,  $\alpha$ -2B,  $\alpha$ -2C) dan serotonin (5-HT1A, 5-HT1B) dengan nilai  $K_i = >10 \mu\text{M}$ . Afiniti pengikatan lemah kepada kedua-dua reseptor adrenergik dan serotonin, menunjukkan bahawa pengoksidaan pada C7 telah menghalang interaksi 7-OH-MTG dengan reseptor-reseptor ini (Ellis et al. 2020). Walau bagaimanapun, penyelidikan terhadap potensi interaksi 7-OH-MTG dengan sistem neurotransmisi serotonin dan adrenergik masih berada peringkat awal dan memerlukan banyak kajian lanjutan.

Secara keseluruhan, 7-OH-MTG dapat berinteraksi secara kuat dengan reseptor opioid dan mempunyai afiniti yang lemah terhadap reseptor bukan opioid (dopamin dan adrenergik). Interaksi-interaksi ini menghasilkan kesan yang berbeza berkaitan dengan sistem saraf yang berlainan. Walau bagaimanapun, penjelasan terperinci mengenai interaksi-interaksi ini masih memerlukan kajian lanjutan, sambil menitikberatkan faktor keselamatan seperti potensi ketagihan, penyalahgunaan, dan kesan sampingan yang tidak diingini.

### 2.3.2 Profil farmakokinetik 7-OH-MTG

Profil farmakokinetik 7-OH-MTG menunjukkan taburan yang luas, metabolisme di hati, penyingkiran melalui sistem perkumuhan. Namun, data farmakokinetik ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Kajian *in vitro* menggunakan model BBB sel endotelium otak babi menunjukkan penyerapan bagi 7-OH-MTG adalah kurang berbanding MTG kerana 7-OH-MTG lebih cenderung untuk efluks dengan nisbah efluks sebanyak  $<1.39$  (Manda et al. 2014; Yusof et al. 2019). Ini juga disokong oleh kadar penembusan ke otak 7-OH-MTG yang lebih rendah daripada MTG dan keupayaannya yang terhad merentasi halangan selular BBB (Kruegel et al. 2019; Manda et al. 2014). Kajian oleh Kruegel et al. 2019 telah menjelaskan bahawa penembusan 7-OH-MTG ke otak adalah lebih sederhana ( $\sim 1:5$  otak:plasma) berbanding sebatian utama ketum, MTG.

Selain itu, 7-OH-MTG mempamerkan pengikatan protein plasma yang tinggi ( $> 90\%$ ) yang ditentukan menggunakan dialisis keseimbangan (Manda et al. 2014; Yusof et al. 2019). Fraksi 7-OH-MTG bebas adalah sebanyak 2.8 kali ganda lebih tinggi dalam plasma tikus ( $f_u$  7-OH-MTG = 0.578) berbanding MTG (Yusof et al. 2019). Hasil ini menjelaskan keafinan pengikatan bagi 7-OH-MTG terhadap protein plasma adalah kurang daripada MTG, namun masih bermakna. Data *in vitro* lain yang diperoleh juga menunjukkan perencatan P-gp oleh 7-OH-MTG yang ketara, sama seperti dadah verapamil (Manda et al. 2014). Ini mencadangkan kemungkinan interaksi ubat berlaku jika 7-OH-MTG diberi bersama dengan ubat lain yang merupakan substrat P-gp. Sebatian 7-OH-MTG, ketamin dan buprenorfina menunjukkan perencatan yang jelas terhadap aktiviti UGT2B7 yang mempengaruhi penyingkiran sebatian xenobiotik. Data ini menunjukkan kemungkinan interaksi antara ubat berlaku jika ketiga-tiga sebatian ini diberikan bersama-sama dengan substrat UGT2B7 (Haron & Ismail 2015). Maka, interaksi 7-OH-MTG dengan protein plasma dan kesannya terhadap perencatan P-gp memainkan peranan penting dalam taburan dan kestabilan sebatian ini.

Sebatian 7-OH-MTG mempunyai kestabilan hampir sama dengan MTG, di mana kajian *in vitro* menunjukkan sebatian 7-OH-MTG dalam cecair gastrik simulasi (pH 1.2)

dengan 27% degradasi dan hanya 6% degradasi didapati dalam cecair usus buatan (pH 6.8) selepas 2 jam inkubasi (Manda et al. 2014). Selain itu, 7-OH-MTG telah terbukti stabil di dalam pelbagai kepekatan plasma tikus (20, 600, 3200 ng/mL) selama 12 jam pada suhu bilik dan selama 30 hari pada suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Vuppala et al. 2013). Meskipun 7-OH-MTG mempunyai kestabilan yang tinggi dalam pelbagai plasma haiwan, namun ia kurang stabil dalam plasma manusia dengan hanya ~40% sebatian ini diperhatikan selepas inkubasi selama 2 jam (Kamble et al. 2020b). Kajian oleh Fu et al. (2015) menunjukkan MTG dan 7-OH-MTG dalam air kencing manusia adalah stabil pada suhu rendah ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) selama dua minggu tanpa menyatakan pH sampel. Kajian oleh Basiliere dan Kerrigan (2020) yang berdasarkan pH (pH 2–8) menunjukkan berlakunya degradasi yang ketara bagi 7-OH-MTG pada suhu tinggi ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  ke atas) (Basiliere & Kerrigan 2020).

Aktiviti *in vitro* yang berkaitan MTG mungkin disebabkan oleh tindakan metabolitnya, 7-OH-MTG, kerana hasil eksperimen *in vitro* dan *in vivo* mendapati bahawa MTG boleh ditukar kepada 7-OH-MTG oleh enzim sitokrom P450 (Kruegel et al. 2019). Enzim metabolik CYP3A4 diketahui memainkan peranan utama dalam memangkinkan metabolisme MTG kepada 7-OH-MTG dalam manusia (Kamble et al. 2019; Kruegel et al. 2019). Todd et al. (2020) telah mencadangkan bahawa perencatan enzim sitokrom P450 terpilih oleh 7-OH-MTG dan dua alkaloid ketum lain boleh meningkatkan pendedahan sistemik kepada ubat serta memberikan kesan buruk atau toksik. Metabolisme 7-OH-MTG dalam mikrosom hati manusia, anjing dan mencit adalah perlahan dengan separuh hayat lebih daripada 60 min, manakala dalam mikrosom hati tikus dan monyet menunjukkan separuh hayat kurang 30 min (Kamble et al. 2020b). Maka, penggunaan 7-OH-MTG harus dipertimbangkan disebabkan potensi penyalahgunaan tinggi yang mungkin meningkatkan pengambilan opioid yang lain (Hemby et al. 2019). Walaupun kadar penukaran 7-OH-MTG selepas pemberian MTG melalui mulut adalah rendah (Hiranita et al. 2020), namun ini boleh menyumbang kepada aktiviti opioid  $\mu$  *in vivo* MTG.

Kajian ciri-ciri farmakokinetik 7-OH-MTG yang sedia ada adalah terhad yang dilakukan beberapa kumpulan penyelidik (Hiranita et al. 2020; Kamble et al. 2021; Vuppala et al. 2013). Kajian melalui pemberian secara oral 7-OH-MTG satu kali sebanyak

4 mg/kg 7-OH-MTG pada tikus mendapati kepekatan plasma maksimum ( $C_{max}$ ) ialah  $3.0 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$  dan diikuti dengan penyingkiran daripada plasma dengan separuh hayat terminal  $22.9 \pm 3.6 \text{ min}$ . Isipadu sebaran dan penyingkiran ialah  $1595.8 \pm 586.3 \text{ mL/kg}$  dan  $44.2 \pm 14.8 \text{ mL/min/kg}$  (Vuppala et al. 2013). Kajian lain menunjukkan kuantiti 7-OH-MTG yang tinggi ditemui dalam plasma tikus, di mana  $C_{max}$  adalah  $4.3 \pm 0.8$  pada  $T_{max} = 0.9 \pm 0.2$  jam bagi pemberian teh ketum terliofil, dan  $C_{max}$  adalah  $4.0 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$  pada  $T_{max} = 3.1 \pm 1.7$  setelah pemberian produk pasaran (Kamble et al. 2021). Berikutan suntikan teh ketum terliofilisasi dan produk komersial kepada tikus, nisbah metabolik 7-OH-MTG kepada MTG didapati  $3.4 \pm 0.9\%$  dan  $3.1 \pm 0.5\%$  (Kamble et al. 2021). Kajian Hiranita et al. 2020 menunjukkan  $T_{max}$  untuk 7-OH-MTG adalah 34 minit dengan  $C_{max}$  adalah 14 kali ganda kurang daripada MTG iaitu  $85 \text{ ng/mL}$  selepas pemberian secara oral. Peratusan nisbah metabolik adalah  $8\% [(AUC_{7\text{-OH-MTG}}/AUC_{\text{MTG}})*100]$  dan peratusan kesan maksimum farmakologi ( $ED_{50}$ ) bagi 7-OH-MTG adalah  $100\%$  (sehingga  $0.1 \text{ mg/kg}$ ) (Hiranita et al. 2020).

Intinya, pemahaman mengenai profil farmakokinetik 7-OH-MTG, termasuk penyerapan, pendedaran, metabolisme, dan penyingkiran dapat membantu menetapkan dos yang tepat dan jadual pemberian yang optimal untuk kegunaan terapeutik. Ini seterusnya dapat memberikan maklumat terperinci tentang keberkesanan, keselamatan, dan potensi risiko seperti ketagihan atau penyalahgunaan. Oleh kerana itu, kepentingan sifat farmakologi 7-OH-MTG ini boleh dimanfaatkan dalam bidang perubatan untuk pembangunan ubat yang lebih efektif dan selamat bagi masyarakat.

#### **2.4 PENGIKATAN LIGAN TERAPEUTIK DENGAN PROTEIN PLASMA DI DALAM SISTEM PEREDARAN MANUSIA**

Pengambilan dadah secara oral sama ada dalam bentuk cecair, kapsul, tablet atau tablet kunyah sering dipraktikkan kepada pesakit kerana mudah, selamat dan murah. Kemudian, dadah tersebut melalui saluran gastrousus dan bergerak ke hati sebelum dihantar ke tapak sasaran melalui sistem peredaran (Loftsson 2015). Protein plasma bertanggungjawab dalam penghantaran dan pengangkutan dadah lipofilik menuju ke tapak farmakologinya

bagi menghasilkan kesan terapeutiknya untuk tempoh masa tertentu. Pengikatan plasma protein adalah penting bagi pencirian dadah kerana mempengaruhi fungsi dadah *in vivo*. Mekanisme pengikatan protein plasma bagi sebatian terapeutik dikaitkan dengan kesan yang jelas terhadap parameter farmakokinetik, termasuklah penyerapan, taburan, metabolisme dan penyingkiran. Ini juga akan mempengaruhi kesan farmakodinamik, iaitu kesan farmakologi sebatian tersebut.

#### 2.4.1 Mekanisme interaksi dengan protein plasma

Pengikatan protein plasma merujuk kepada tahap pengikatan dadah dalam darah yang mempengaruhi efikasi molekul dadah tersebut. Di dalam darah, terdapat dua keadaan bagi dadah iaitu terikat atau tak terikat dengan protein plasma. Dadah yang mengikat pada protein plasma akan membentuk kompleks protein–dadah. Pengikatan biasanya boleh berbalik dan kedua-dua bentuk sama ada dadah tidak terikat (bebas) atau dadah terikat hadir dalam keadaan ekuilibrium (Deb et al. 2018).

Dadah tak terikat pada protein plasma adalah berkesan secara farmakologi akibat interaksinya dengan reseptor sasaran yang bergantung kepada ciri-ciri kimia molekul dadah tersebut (Smith & Rowland 2019). Hal ini disebabkan kepekatan dadah bebas yang berada pada sasaran metabolik menentukan kelakuan keseluruhan sesuatu dadah. Apabila fraksi dadah bebas berkurang, maka dadah yang terikat pada protein plasma akan tercerai dari tapak pengikatan untuk meningkatkan semula fraksi dadah bebas. Manakala, dadah yang terikat pada protein plasma lebih cenderung kekal dalam darah kerana saiz kompleks protein–dadah biasanya terlalu besar mengehendkan distribusi dadah menuju tapak sasaran. Ini mempengaruhi kesan terapeutik dadah kerana dadah terikat tidak bersedia berinteraksi dengan reseptor terapeutik dan tidak menjalankan aktiviti farmakologinya (Bhosle et al. 2017; Loftsson 2015; Smith & Rowland 2019).

Selain itu, pengikatan protein plasma juga mempengaruhi penyingkiran sesuatu dadah, di mana dadah yang mempunyai afiniti tinggi terhadap protein plasma adalah kurang tersedia untuk metabolisme di hati dan perkumuhan oleh buah pinggang (Deb et al. 2018).

Antara faktor yang mempengaruhi keseimbangan antara dadah terikat dan dadah tak terikat dalam plasma adalah afiniti terhadap protein, kepekatan dadah dan protein, serta persaingan daripada dadah lain untuk penempatan tapak pengikatan pada protein (Bhosle et al. 2017; Howard et al. 2010). Keafinan pengikatan kuat ( $K_a > 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) boleh menyebabkan kepekatan ligan bebas berkurang secara ketara dan menurunkan bioketersediaan sebatian tersebut. Manakala, pengikatan lemah (kurang  $K_a < 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) sering dikaitkan dengan separuh hayat dadah yang pendek dan keberkesanan terapeutik berkurangan kerana mudah disingkirkan dan dikumuhkan oleh tubuh (Schmidt, Gonzalez & Derendorf 2010).

Antara kepentingan pengikatan dadah dengan protein plasma adalah meningkatkan kelarutan dadah dalam plasma, terutamanya sebatian hidrofobik yang biasanya tidak sesuai dengan persekitaran akues plasma (Wanat 2020). Malah, kestabilan dadah juga meningkat apabila berkompleks dengan protein plasma dengan mengurangkan proses eliminasi yang seterusnya memanjangkan separuh hayat dadah *in vivo* (Ezike et al. 2023; Wanat 2020). Pengikatan protein plasma juga dapat melindungi dadah daripada proses pengoksidaan kerana protein plasma berfungsi sebagai antioksidan (Schmidt, Gonzalez & Derendorf 2010). Perlindungan daripada pengoksidaan dapat mengekalkan kestabilan dan kelakuan dadah semasa pengedarannya ke seluruh tubuh. Tambahan lagi, pengikatan protein plasma juga boleh mengurangkan jumlah dadah bebas di sistem peredaran, yang akhirnya dapat mengurangkan ketoksikan dadah tersebut (Bohnert & Gan 2013; Ezike et al. 2023). Pengurangan ketoksikan dadah ini dikaitkan dengan pengurangan dadah bebas, meminimumkan aktiviti farmakologi berlebihan, perlindungan daripada proses metabolisme dan degradasi yang tidak diinginkan.

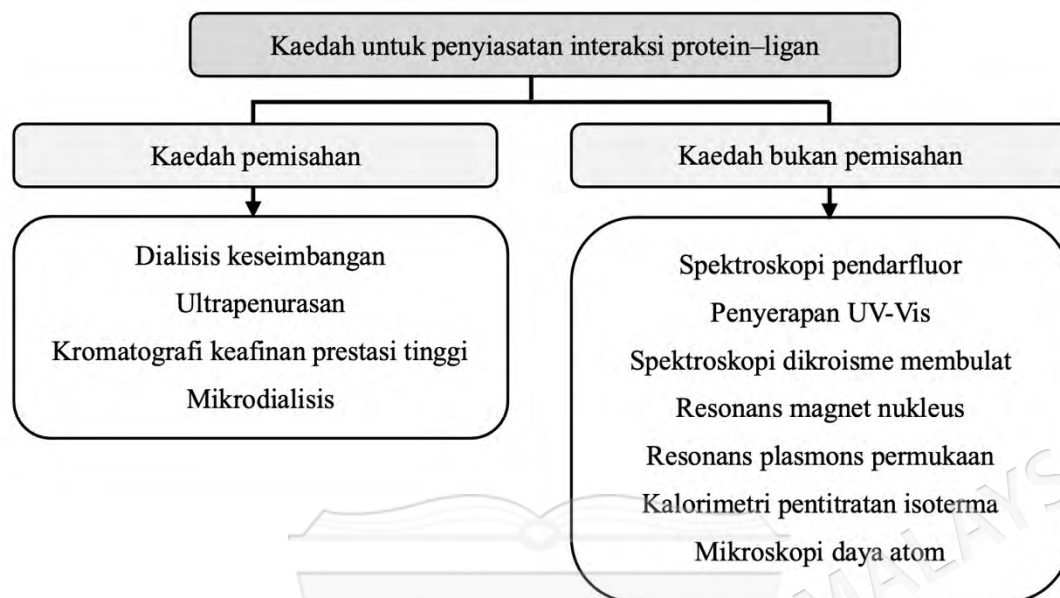
Terdapat dua hipotesis dadah bebas yang digunakan sebagai prinsip asas penemuan dadah dalam bidang farmakologi klinikal. Hipotesis pertama mengandaikan bahawa kepekatan molekul dadah yang tidak terikat dalam aliran darah berada dalam keadaan ekuilibrium dengan kepekatannya di tapak sasaran (Chen et al. 2020; Trainor 2007). Namun begitu, terdapat pengecualian hipotesis ini bagi beberapa dadah (morfin, gabapentin, atenolol) yang mempunyai kebolehtelapan pasif rendah, di mana kepekatannya jauh lebih rendah dalam otak daripada dalam plasma (Chen et al. 2020). Ini menunjukkan

bahawa hipotesis dadah bebas hanya boleh digunakan untuk dadah dengan kebolehtelapan baik dan merupakan substrat pengangkut influks (Chen et al. 2020; Smith, Di & Kerns 2010). Hipotesis dadah bebas kedua pula menerangkan bahawa hanya dadah bebas yang aktif secara farmakologi, mampu berinteraksi dengan reseptor sasaran dan menghasilkan kesan yang diinginkan (Summerfield, Yates & Fairman 2022). Walau bagaimanapun, terdapat pengecualian untuk hipotesis ini, misalnya keadaan dinamik sistem organisma yang berbeza dengan keadaan dalam pengasaian *in vitro*. Oleh itu, keberkesanan MTG dan 7-OH-MTG *in vivo* dijangkakan tidak semestinya berkait dengan eksperimen *in vitro*, yang mungkin disebabkan oleh kehadiran protein plasma di dalam sistem peredaran yang mempengaruhi ciri-ciri farmakokinetik sebatian-sebatian psikotropik ini.

Secara tuntasnya, pengikatan dadah kepada protein plasma mempunyai kesan terhadap farmakologi sesuatu dadah. Hanya dadah tidak terikat yang dapat menjalankan tindak balas farmakologi di tapak sasaran. Konsep ini penting dalam memahami hubungan farmakokinetik-farmakodinamik dadah, kerana ia membantu dalam meramal dan memahami kelakuan dadah berdasarkan kepekatan dadah dalam badan.

#### **2.4.2 Kaedah-kaedah penentuan pengikatan protein–ligan**

Pengikatan protein plasma adalah ciri-ciri penting yang perlu dinilai pada peringkat awal dalam pengoptimuman dan penyaringan calon dadah berpotensi. Maklumat mengenai pengikatan protein plasma dengan ligan boleh diakses menerusi kaedah pemisahan dan kaedah bukan pemisahan (Rajah 2.4). Kaedah pemisahan melibatkan pemisahan ligan bebas daripada spesies terikat dan digunakan untuk menentukan secara langsung kepekatan dadah tidak terikat atau terikat. Manakala, kaedah bukan pemisahan adalah pengesanan perubahan sifat fizikokimia sama ada ligan atau protein yang disebabkan oleh pengikatan (Sharma & Pathania 2021; Vuignier et al. 2010). Pemilihan kaedah yang bersesuaian adalah penting untuk menilai interaksi antara protein dan ligan yang bergantung kepada ciri-ciri protein dan ligan sasaran.



Rajah 2.4 Kaedah-kaedah bagi penentuan afiniti pengikatan protein dan dadah

Kaedah dialisis keseimbangan (ED) adalah penentuan pembahagian dadah merentasi membran separa-boleh telap antara kompartmen protein dan kompartmen penimbal bagi pembentukan keadaan keseimbangan (Damre & Iyer 2012; Trainor 2007). Meskipun peralatan untuk asai ED lebih murah, namun ia memerlukan masa eksperimen yang agak panjang, yang boleh menjadi masalah serius bagi dadah yang tidak stabil. Kini, kaedah ini telah ditingkatkan kepada dialisis keseimbangan cepat (RED) menggunakan membran yang lebih telap untuk hasil yang lebih cepat dan ketara (Howard et al. 2010; Wanat, Brzezińska & Sobańska 2018). Manakala, kaedah ultrapenurasan (UF) dilakukan dengan menuras matriks dadah–protein melalui membran separa-boleh telap di bawah tekanan positif daripada pengemparan (Damre & Iyer 2012). Kaedah ini mudah, cepat, tetapi hasilnya mungkin tidak konsisten disebabkan oleh tahap pengikatan yang tidak spesifik tinggi dan tiada kawalan suhu (Hann et al. 2022). Kaedah konvensional seperti ED dan UF tidak sesuai untuk menentukan interaksi antara sebatian bersaiz hampir sama kerana ia bergantung kepada perbezaan saiz molekul.

Selanjutnya, kaedah kromatografi keafinan prestasi tinggi (HPAC) yang digunakan untuk pengikatan dadah–protein berdasarkan pemegungan protein sasaran pada fasa pegun dan mengekalkan dadah secara selektif (Hann et al. 2022; Wanat, Brzezińska & Sobańska 2018; Wang et al. 2022). Kaedah ini mempunyai kepekaan yang terhad kerana hanya boleh mengukur dengan tepat bagi dadah yang mempunyai 99% pengikatan ke atas (Hann et al. 2022). Perubahan struktur yang kadang-kadang berlaku juga boleh mengurangkan kapasiti pengikatan protein (Wanat, Brzezińska & Sobańska 2018). Kaedah *in vivo* iaitu mikrodialisis juga digunakan untuk mengukur kepekatan dadah tak terikat yang melibatkan pengambilan sampel dadah secara langsung dari cecair ekstraselular melalui saluran darah atau tisu (Damre & Iyer 2012; Deb et al. 2018). Kaedah ini dilakukan dengan sebuah prob yang terdiri daripada tiub dan membran separa-boleh telap yang diletakkan ke dalam tisu sasaran. Kaedah ini bergantung kepada peresapan pasif dadah tak terikat merentasi membran mengikut kecerunan kepekatannya (Deb et al. 2018). Kelebihan kaedah ini dalam memberikan data yang berterusan dan tepat tidak dinafikan, namun ia sangat tidak praktikal untuk digunakan secara rutin kerana melibatkan prosedur yang rumit dan kos tinggi.

Sementara itu, kaedah spektroskopi termasuklah UV-Vis, pendarfluor, resonans magnet nukleus (NMR) dan dikroisme membulat (CD) adalah kaedah bukan pemisahan berasaskan pada perubahan paras tenaga elektronik bagi ligan atau protein disebabkan oleh pengikatan (Vuignier et al. 2010; Wang et al. 2022). Perubahan spektrum pancaran protein setelah pengujian dalam kaedah spektroskopi pendarfluor diaplikasikan untuk menentukan nilai  $K_a$  bagi interaksi ligan dengan protein (Zacharioudaki, Fitisilis & Kotti 2022). Kaedah spektroskopi CD boleh memberikan maklumat mengenai struktur sekunder dan tertier protein melalui pengukuran perbezaan penyerapan cahaya terkutub membulat oleh sebatian aktif optik (Miles, Janes & Wallace 2021). Perubahan permukaan molekul protein tanpa dan dengan kehadiran ligan boleh divisualisasi pada resolusi tinggi menggunakan kaedah mikroskopi daya atom (AFM) (Müller et al. 2021; Pleshakova et al. 2018). Kaedah ini hanya memerlukan kuantiti sampel yang kecil dan tidak memerlukan perlabelan pendarfluor atau radioaktif (Pleshakova et al. 2018).

Manakala, kalorimetri pentitratan isoterma (ITC) merupakan satu-satunya kaedah yang mengukur secara langsung pertukaran haba semasa pembentukan kompleks protein–ligan pada suhu malar (Du et al. 2016; Wang et al. 2022). Kaedah ini mempunyai kepekaan tinggi kerana mampu mengukur kadar haba sekecil 0.1  $\mu\text{cal/s}$  dan membolehkan penentuan pemalar pengikatan ( $K_a$ ) setinggi  $10^8$ – $10^9$   $\mu\text{M}$  (Du et al. 2016). Bukan sahaja nilai  $K_a$ , parameter pengikatan dan termodinamik yang lain juga dapat dikenalpasti daripada kaedah ITC seperti  $n$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  dan  $\Delta G$  (Srivastava & Yadav 2019). Kelebihan kaedah ini berbanding kaedah lain adalah cepat, tepat dan tanpa memerlukan modifikasi kimia atau penandaan (Du et al. 2016). Kaedah ITC lebih sesuai untuk pengukuran yang meliputi julat lebih luas, namun resonans plasmons permukaan (SPR) biasanya digunakan untuk keafinan pengikatan yang tinggi dalam julat pengukuran lebih kecil (Du et al. 2016). SPR merupakan kaedah berasaskan optik yang mengukur perubahan indeks bias berhampiran dengan sensor dan berkeupayaan mengukur kinetik dan afiniti pengikatan protein–ligan secara masa nyata (Du et al. 2016; Sharma & Pathania 2021). Pendekatan spektroskopi dan SPR sangat berkesan untuk menentukan pengikatan kompleks 1:1, namun tidak begitu berkesan untuk multi-pengikatan (Vuignier et al. 2010). Kaedah HPAC atau SPR adalah lebih sesuai untuk penentuan sebatian bioktif berketerlarutan rendah kerana mempunyai sensitiviti yang lebih besar berbanding spektroskopi dan kalorimetri (Vuignier et al. 2010).

Selain itu, kaedah bioinformatik yang berasaskan teknologi komputer telah menjadi pilihan kepada penyelidik masa kini disebabkan hanya memerlukan masa singkat dan kos rendah untuk penyaringan calon dadah yang berpotensi. Antaranya, simulasi dok molekul yang digunakan untuk meramalkan mod pengikatan secara *in silico*. Kaedah ini terdiri kepada dua peringkat iaitu pensampelan konformasi dan penilaian skor (Meng et al. 2011; Salmaso & Moro 2018). Antara perisian-perisian simulasi dok molekul yang telah teruji adalah AutoDock, GOLD, DOCK, SwissDock, FlexX dan GLIDE (Du et al. 2016; Naqvi et al. 2018). Seterusnya, simulasi dinamik molekul yang digunakan untuk mendapatkan maklumat mengenai perubahan koordinat atom protein dengan atau tanpa ligan bersandar masa untuk menilai perubahan entropi konformasi apabila interaksi berlaku (Du et al. 2016). Antara pakej perisian lengkap untuk MD yang tersedia adalah GROMACS, AMBER, NAMD dan CHARMM (Naqvi et al. 2018; Salo-Ahen et al. 2020). Intinya,

kedua-dua kaedah pengkomputeran utama ini digunakan dalam pendekatan reka bentuk dadah berasaskan struktur untuk memahami struktur 3D kompleks protein dengan sebatian kecil lebih mendalam.

Kesimpulannya, pelbagai kaedah telah digunakan untuk menentukan pengikatan protein dadah, setiap kaedah mempunyai kelebihan dan kelemahan tersendiri, dan penggunaan lebih daripada satu kaedah adalah diperlukan untuk penyaringan dadah yang berpotensi. Maka, beberapa kaedah termasuklah biofizik (kalorimetri, mikroskopi dan multi-spektroskopi) dan bioinformatik (simulasi dok dan dinamik molekul) telah digunakan dalam kajian ini.

## 2.5 ALBUMIN SERUM MANUSIA

Albumin serum manusia (HSA) adalah protein plasma dengan kuantiti paling banyak yang merangkumi 50–60% daripada jumlah keseluruhan protein plasma. HSA merupakan protein monomerik dan ia tidak mempunyai kumpulan prostetik, karbohidrat atau lipid yang terikat secara kovalen. Protein HSA disintesis di dalam sel hepar sebanyak 10–15 g setiap hari dan kemudiannya dirembeskan ke dalam darah (Larsen et al. 2016). Anggaran kepekatan HSA adalah sekitar 500–750  $\mu\text{M}$  (3.0–5.0 g/dL) dan mempunyai separuh hayat selama 19–20 hari (Rimac et al. 2017). Ia mempunyai ciri-ciri berasid, mempunyai cas bersih adalah  $-15$  pada pH fisiologi 7.4 dan titik isoelektrik iaitu pada 4.7 (Bteich 2019; Peters 1996).

### 2.5.1 Struktur HSA

Sintesis HSA diekspreskan oleh gen tunggal yang terletak pada kromosom 4 (kedudukan g11–13), yang juga merupakan lokasi bagi gen untuk famili albumin yang lain (Kragh-Hansen 2016). Gen albumin adalah 16 961 nukleotida panjang dari tapak *cap* putatif ke tapak penambahan poli(A) pertama dan terdiri daripada 14 intron dan 15 ekson yang berselang. Ekson diletakkan secara simetri dalam tiga domain yang mungkin disebabkan daripada replikasi domain primordial tunggal (Caridi et al. 2022). Jujukan mRNA bagi HSA mengkodkan protein pelopor (preproalbumin) sebanyak 609 residu asid amino.

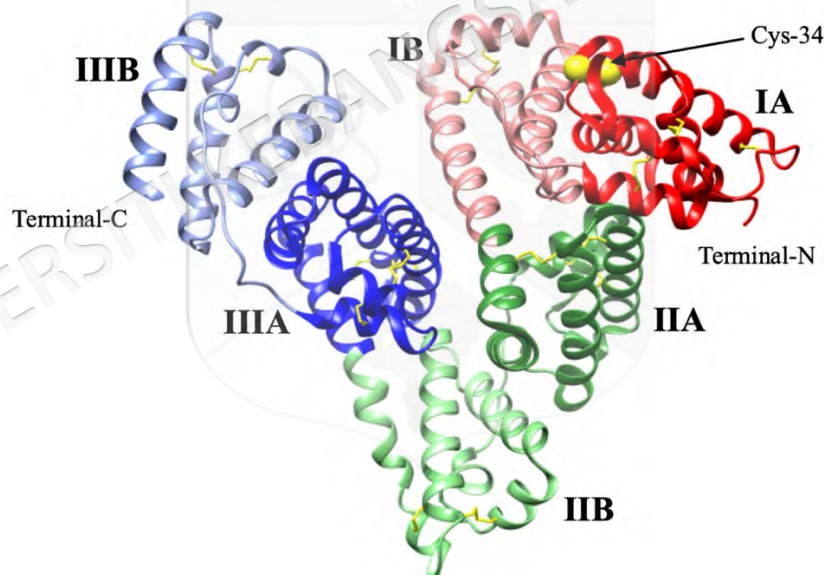
Daripada jumlah tersebut, 18 residu adalah peptida isyarat pembelahan, 6 residu adalah propeptida dan selebihnya adalah residu protein matang (Bteich 2019; Caridi et al. 2022). Berat molekul HSA adalah 66.5 kDa dan terdiri daripada polipeptida tunggal yang meliputi sebanyak 585 asid amino (Larsen et al. 2016). Bilangan residu asid amino yang terdapat pada protein HSA adalah disenaraikan dalam Jadual 2.3.

Jadual 2.3 Komposisi asid amino bagi protein HSA

Kumpulan asid amino				Bilangan residu
A) Tidak berkutub	Alanina	Ala	A	62
	Fenilalanina	Phe	F	31
	Glisina	Gly	G	12
	Isoleusin	Ile	I	8
	Leusin	Leu	L	61
	Metionina	Met	M	6
	Prolina	Pro	P	24
	Sisteina	Cys	C	35
	Triptofan	Trp	W	1
	Valina	Val	V	41
B) Berkutub	Asparagina	Asn	N	17
	Glutamina	Gln	Q	20
	Serina	Ser	S	24
	Tirosin	Tyr	Y	18
	Treonina	Thr	T	28
	C) Bercas positif	Arginina	Arg	R
Lisina		Lys	K	59
Histidina		His	H	16
D) Bercas negatif	Asid aspartik	Asp	D	36
	Asid glutamik	Glu	Z	62
<b>Jumlah</b>				<b>585</b>

Sumber : Adaptasi daripada Peters 1985

Berdasarkan Jadual 2.3, residu asid amino terion yang tinggi dari residu bercas negatif (Asp, Glu) dan residu bercas positif (Arg, Lys, His) menyebabkan protein ini sangat larut dalam media berakues. HSA mempunyai residu Trp tunggal (Trp-214), berbeza dengan serum albumin bovin (BSA) yang mempunyai dua residu Trp (Trp-212 dan Trp-134) (Peters 1985). Jujukan asid amino lainnya iaitu Ile (8) dan Met (6) adalah kurang, tetapi komposisi residu Ala (62), Leu (61), Lys (59) dan Glu (62) adalah sangat tinggi (Peters 1985). Data kristalografi menunjukkan struktur 3D HSA yang seiras bentuk jantung dengan dimensi  $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$  (Rajah 2.5). Struktur kristal HSA terbentuk dari tiga domain utama (I, II dan III). Setiap domain terbahagi kepada dua subdomain (A dan B) yang diwakili subdomain IA (residu asid amino 1–105), IB (residu asid amino 106–195), IIA (residu asid amino 196–292), IIB (residu asid amino 293–383), IIIA (residu asid amino 384–491) dan IIIB (residu asid amino 492–585) (Sugio et al. 1999).

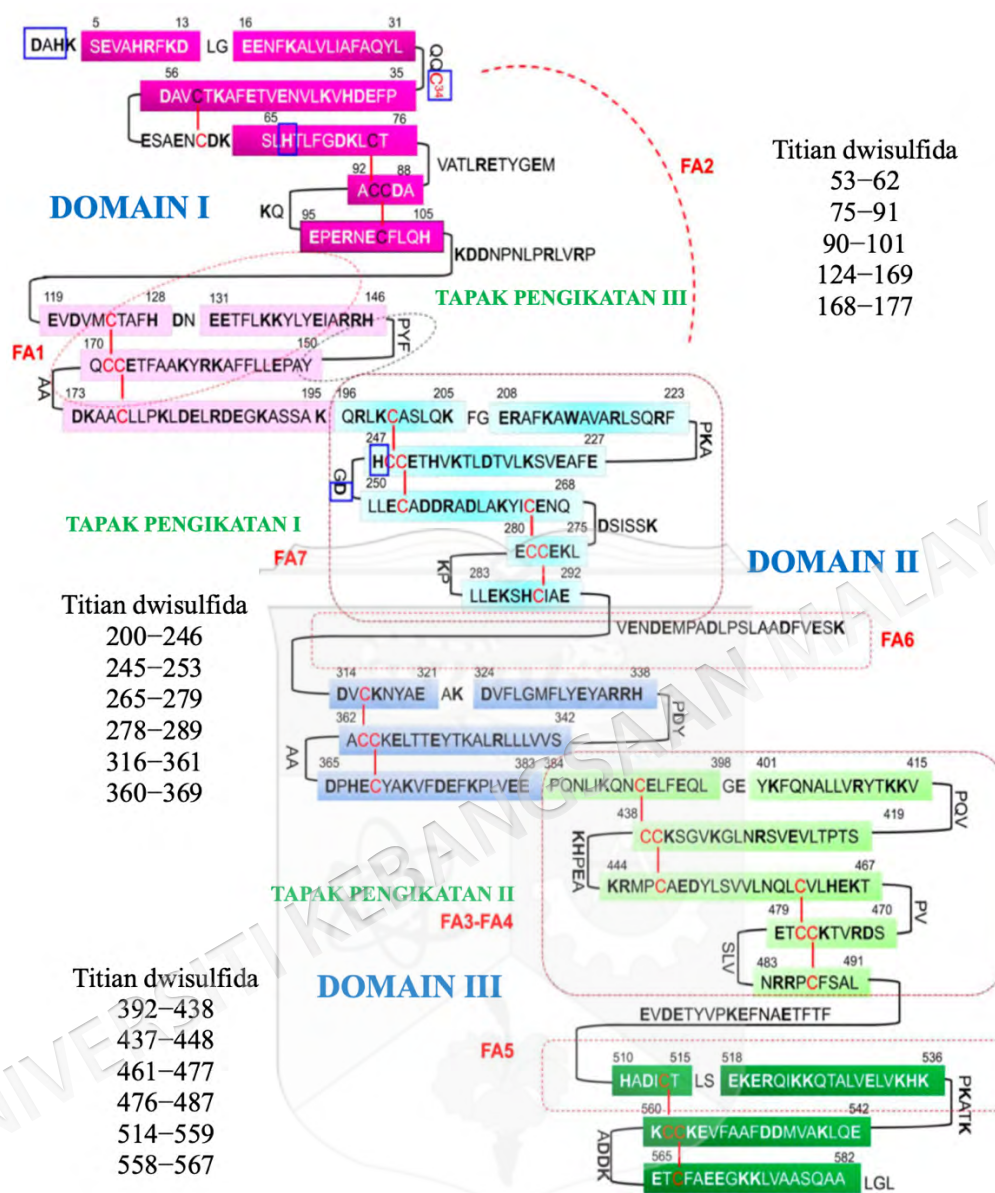


Rajah 2.5 Struktur 3D kristal HSA (PDB: 1E7E). Domain HSA (I–III) dan subdomain (A dan B) diwarnakan dengan merah (IA), merah muda (IB), hijau (IIA), hijau muda (IIB), biru (IIIA) dan biru muda (IIIB). Titian dwisulfida digambarkan dengan batang kuning, manakala residu Cys-34 pada subdomain IA diwakili dengan sfera kuning.

Sumber : Adaptasi daripada Larsen et al. 2016

Berdasarkan analisis kristalografi sinar-X struktur sekunder bagi HSA, didapati bahawa protein ini mempunyai komposisi heliks- $\alpha$  yang tinggi, iaitu melebihi separuh struktur protein ini iaitu sebanyak 67%, dengan  $\beta$ -turn sebanyak 10% dan kawasan fleksibel yang terletak di antara setiap subdomain mencapai 23%, tanpa lembaran- $\beta$  (Carter & Ho 1994). Walau bagaimanapun, anggaran struktur sekunder HSA berdasarkan kaedah spektroskopi FT-IR adalah 52% heliks- $\alpha$ , 18% gegelung rawak, 19%  $\beta$ -turn dan terdapat kehadiran lembaran- $\beta$  sebanyak 11% (Wang et al. 2015). Manakala, analisis struktur sekunder HSA menggunakan spektroskopi dwikroisme membulat dianggarkan meliputi 58% heliks- $\alpha$ , 20% lembaran- $\beta$  (selari dan tak selari) dan 22% gegelung rawak (Dubey et al. 2018). Perbezaan ini kemungkinan disebabkan oleh pelbagai faktor, termasuklah kaedah analisis yang berbeza, penyediaan sampel protein yang berbeza, serta susunan struktur protein yang mungkin berubah dalam keadaan larutan yang berbeza (Wang et al. 2015). Ini menunjukkan bahawa penentuan struktur sekunder protein adalah subjektif terhadap kaedah analisis yang digunakan serta keadaan eksperimen yang berkaitan.

Skematik struktur sekunder digambarkan dalam Rajah 2.6 menunjukkan subdomain A yang terdiri daripada enam struktur heliks- $\alpha$ , manakala subdomain B pula terdiri daripada empat heliks- $\alpha$ . Penyambungan domain I–II (173–205) dan II–III (365–398) menghasilkan dua struktur heliks terpanjang HSA yang menyebabkan jumlah heliks sebenar adalah 28, bukannya 30 (Sugio et al. 1999). Kefleksibalan dan kestabilan konformasi protein pada pH fisiologi dipengaruhi oleh kehadiran 17 pasang titian dwisulfida (Paris et al. 2012; Sugio et al. 1999). Domain I memiliki 5 pasang titian dwisulfida, manakala domain II dan III dengan masing-masing memiliki 6 pasang titian dwisulfida. Terdapat satu residu sistena yang tidak terlibat dalam interaksi titian dwisulfida iaitu Cys-34 yang diwakili sfera berwarna kuning dalam Rajah 2.5. Titian dwisulfida ini memainkan peranan penting dalam kestabilan protein, yang secara tidak langsung memanjangkan jangka hayat biologi dan mengekalkan struktur 3D protein (Nurdiansyah, Rifa'i & Widodo 2016). Ini merupakan aspek penting dalam kestabilan dan peranan biologi protein bagi memastikan protein dapat berfungsi dengan baik dalam persekitaran yang berbeza.



Rajah 2.6 Gambaran skematik struktur sekunder dan titian dwisulfida bagi topologi protein HSA. Struktur heliks digambarkan segiempat, gegelung diwakili garisan berwarna hitam dan titian dwisulfida diwakili garisan berwarna merah. Setiap subdomain diwakili dengan kod warna tertentu (IA: merah jambu tua, IB: merah jambu muda, IIA: biru muda, IIB: biru tua, IIIA: hijau muda, IIIB: hijau tua). Tapak pengikatan asid lemak ditunjukkan dengan garisan putus-putus berwarna merah, manakala tapak pengikatan logam dibulatkan dengan garisan putus-putus berwarna hitam.

Sumber: Adaptasi daripada Al-Harhi et al. 2019

### 2.5.2 Peranan dan kepelbagaian fungsi protein HSA

Sebagai protein plasma utama dalam darah, HSA memainkan peranan penting dalam badan manusia. Fungsi asasnya meliputi menyeimbangkan tekanan osmotik, memberikan perlindungan terhadap radikal bebas serta mengangkut nutrien dan molekul. Dalam bidang perubatan, HSA digunakan untuk merawat penyakit seperti diabetes, barah, sepsis, hepatitis, dan dalam diagnosis serta pengimejan. Sebagai vektor penghantaran dadah, HSA memungkinkan penghantaran dadah yang terkawal untuk rawatan penyakit (Dewangan 2020).

Di dalam kapilari darah, protein HSA mempunyai kesan onkotik dan bercas negatif yang menyumbang kepada 80% tekanan osmotik (Bairagi, Mittal & Mishra 2015; Dewangan 2020). HSA juga memainkan peranan utama untuk mengekalkan pH darah (Bern et al. 2015). Ini dibuktikan dengan penglibatan HSA dalam kestabilan lapisan endotelium dan mengekalkan ketelapan kapilari normal dengan mengurangkan kerosakan oksidatif dan memodulasi keradangan (Caraceni, Tufoni & Bonavita 2013). Menariknya, HSA mempunyai aktiviti enzim yang terlibat dalam beberapa aktiviti hidrolisis, seperti aktiviti bak esterase dan aktiviti tioesterase (Kragh-Hansen 2016). HSA dianggap sebagai depot penting bagi molekul pengisyaratan utama, nitrik oksida (NO). Keupayaan HSA mengikat NO telah memanjangkan bioaktiviti NO seperti vasolidasi dan merencat pengagregatan platelet (Spinella, Sawhney & Jalan 2015). HSA memperlihatkan aktiviti seperti anti-trombotik, yang terbukti dengan pengurangan bekuan darah bagi individu paras albumin tinggi berbanding individu paras albumin normal berdasarkan pengukuran trombelastometri (TEM) (Paar et al. 2017).

Selain itu, HSA bertindak sebagai pembawa sisa toksik dengan mengikat bilirubin (BR), iaitu produk sisa katabolisma heme dan mengangkutnya ke hati untuk disingkirkan (Moosavi-Movahedi et al. 2006). Aktiviti anti-oksidan albumin muncul secara tidak langsung ketika HSA mengikat BR pada tapak primernya dan bertindak sebagai perencat peroksidaan lipid. Kompleks BR-HSA juga membantu melindungi  $\alpha$ -tocopherol daripada kerosakan yang diperantara oleh radikal peroksil (Roche et al. 2008). Peranan anti-oksidan

albumin juga termasuk mengurangi jumlah spesies reaktif oksigen (ROS) dan spesies reaktif nitrogen (RNS) yang melibatkan kumpulan tiol pada Cys-34 HSA (Anraku et al. 2013; Roche et al. 2008). Residu asid amino Cys-34 terdedah di permukaan protein juga berinteraksi dengan pelbagai ion logam (kuprum, kobalt, nikel dan zink) dan seterusnya menghadkan aktiviti redoksnya yang menghasilkan radikal bebas (Caraceni, Tufoni & Bonavita 2013; Fanali et al. 2012). Ini juga disokong oleh kajian lain yang menegaskan bahawa terdapat banyak ion logam yang mengedok pada tapak pengikatan khusus pada residu sistein protein ini (Bal et al. 2013). HSA juga berfungsi melindungi asid lemak dan lipoprotein daripada kerosakan peroksidatif (Fanali et al. 2012).

Dalam bidang perubatan, penggunaan albumin berperanan mengikat dan menyingkirkan bilirubin (BR), yang menjadi penyebab penyakit hemolisis bagi bayi baru lahir (Larsen et al. 2016; Ree et al. 2017). Selain itu, pemberian intravena albumin kepada kumpulan pesakit peritonitis bakteria spontan yang berisiko tinggi juga mampu mengurangkan kadar kematian sebanyak 28.8% berbanding tanpa rawatan albumin sebanyak 46.8% (Poca et al. 2012). Penggunaan albumin semasa pembedahan pintasan kardiopulmonari juga berkesan melindungi glikokaliks endotelium dengan mengurangkan hipervolemia bagi mengekalkan tekanan berkoloid dan tidak mempengaruhi koagulasi darah (Vlasov et al. 2020). Terapi berkoloid albumin berpotensi merawat pesakit hipoproteinemik yang mengalami masalah kesukaran bernafas (Polito & Martin 2013). Namun, kajian yang terhad menyebabkan ketidakjelasan terhadap potensi albumin dalam mengatasi simptom kesukaran bernafas (Uhlrig et al. 2014).

Selanjutnya, penggunaan HSA sebagai protein pembawa telah diaplikasikan dalam bidang diagnosis dan pengimejan seperti pengimejan resonans magnet (MRI) (Dobrynin et al. 2020), terapi fototerma (PTT) (Ma et al. 2020), terapi fotodinamik (PDT) (Zheng et al. 2020), dan teranostik (Ishay et al. 2016). Kepekatan albumin di dalam serum seseorang individu telah digunakan sebagai penunjuk bagi menerangkan keadaan kesihatan dan nutrisi individu tersebut. Contohnya, HSA digunakan sebagai penanda prognostik bagi pesakit AIDS (Ronit et al. 2017), manakala HSA terglukolasi adalah indikator yang baik untuk diagnosis penyakit diabetes mellitus (Raghav, Ahmad & Alam 2017). Beberapa

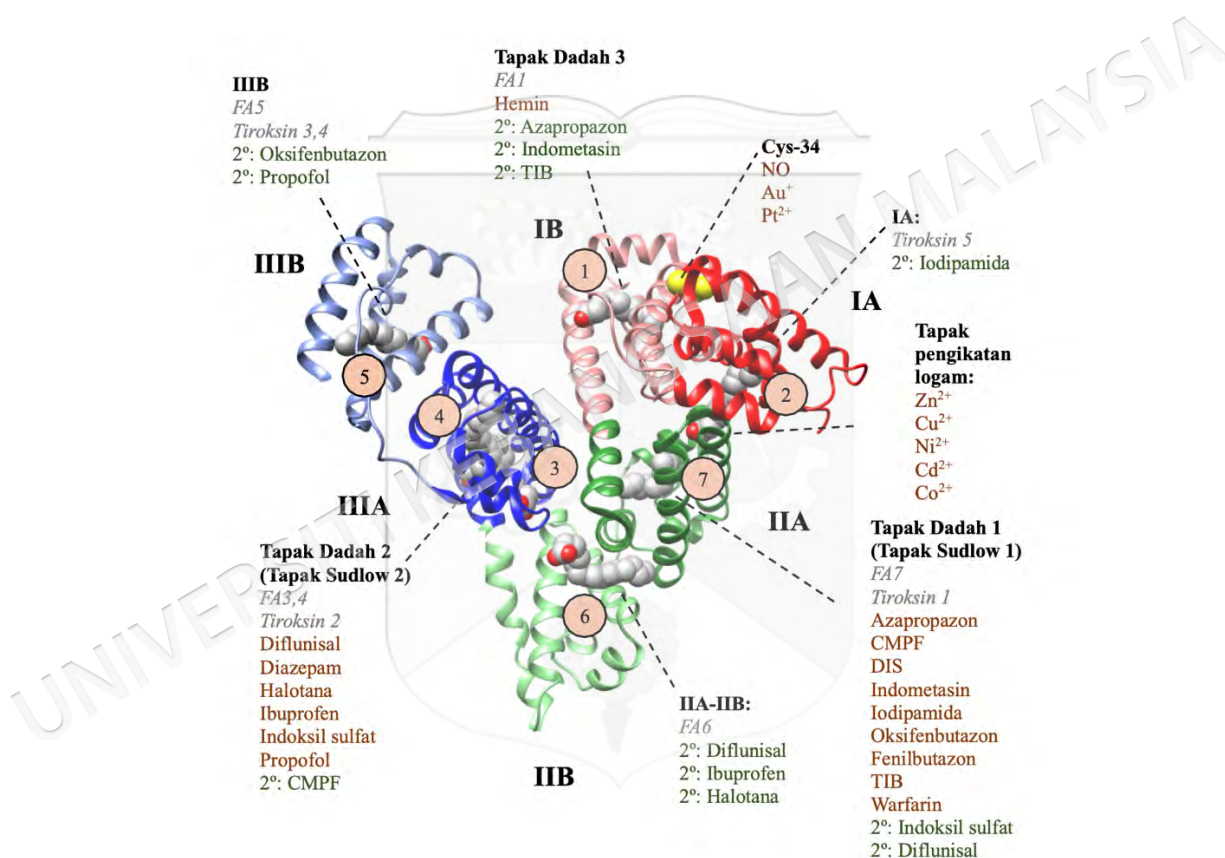
pendekatan yang digunakan penyelidik untuk membangunkan kompleks albumin–dadah seperti perlakuan dengan protein yang mempunyai berat molekul rendah, pempolimeran dan pengubahsuaian albumin. Misalnya, Abraxane® iaitu albumin–palitaxel untuk rawatan kanser payudara, dan Albinterferon® iaitu albumin yang dilakurkan bersama interferon  $\alpha$ -2 $\beta$  untuk rawatan hepatitis C (Ma et al. 2020). Penkonjugatan albumin–dadah secara kovalen, seperti Aldoxorubisin® iaitu derivatif maleimide bagi dadah antikanser doxorubisin boleh meningkatkan keberkesanan terapi kanser (Tayyab & Feroz 2021). Manakala, konjugasi albumin–dadah secara bukan kovalen iaitu Levemir® yang merupakan analog insulin yang dimodifikasi dengan penambahan asid miristik pada HSA, telah digunakan untuk rawatan diabetes (Larsen et al. 2016).

Tambahan lagi, HSA juga berfungsi sebagai pengangkut dinamik yang membawa pelbagai molekul kecil, terutamanya yang mempunyai keterlarutan akues yang rendah, di seluruh sistem peredaran manusia. Ia mampu mengangkut pelbagai sebatian endogenus dan eksogenus dan bertindak sebagai pengangkutan utama untuk dadah asidik seperti warfarin, fenilbutazon, azapropazon, aspirin, asid kaprik dan ketoprofen (De Simone, di Masi & Ascenzi 2021; Maciążek-Jurczyk et al. 2020; Yang, Zhang & Liang 2014). Ia juga berupaya mengikat sebahagian dadah yang bersifat neutral dan basik seperti asebutolol dan metoprolol (Martínez-Gómez et al. 2006). Pengikatan ligan ke protein plasma HSA adalah selektif dan berlaku di tapak-tapak pengikatan tertentu pada protein ini. Hal ini menunjukkan bahawa HSA tidak hanya mengikat dan mengangkut dadah dengan efektif, namun boleh mengekalkan kestabilan dan fungsinya sebagai protein pengangkut utama dalam sistem peredaran manusia.

Natijahnya, HSA merupakan protein plasma multi-fungsi yang penting dalam pengawalaturan tekanan osmotik, pengangkutan pelbagai sebatian dadah serta digunakan dalam aplikasi klinikal. Oleh demikian, kepelbagaian fungsi HSA telah menjadi landasan yang baik untuk meneroka lebih mendalam kepentingannya dalam bidang perubatan. Fokus kajian ini adalah untuk menyelidik interaksi sebatian psikotropik ketum (MTG dan 7-OH-MTG) yang dapat memberikan maklumat tentang pengangkutan dalam sistem peredaran dan potensi kesannya terhadap fungsi biologi HSA.

### 2.5.3 Tapak-tapak pengikatan HSA

HSA mempunyai beberapa tapak pengikatan utama: tapak pengikatan I pada subdomain IIA, tapak pengikatan II pada subdomain IIIA dan tapak pengikatan III pada subdomain IB HSA. Selain itu, terdapat ligan-ligan tertentu yang lebih cenderung mengikat pada lokasi selain tapak pengikatan utama. Visualisasi kepelbagaian tapak pengikatan HSA serta contoh ligan dan dadah yang mengikat serta koordinasinya adalah ditunjukkan lebih terperinci pada Rajah 2.7.



Rajah 2.7 Lokasi tapak pengikatan pelbagai ligan pada HSA. Ilustrasi ini menunjukkan struktur HSA (PDB:17EH) dengan kehadiran tujuh asid palmitik (kelabu). Ketiga-tiga domain (I–III) dan subdomain (A dan B) telah dinyatakan. Lokasi tapak pengikatan Sudlow I (subdomain IIA), tapak pengikatan Sudlow II (subdomain IIIA), tapak pengikatan 3 (subdomain IB), tapak pengikatan logam dan tapak-tapak lain telah ditunjukkan.

Sumber : Adaptasi daripada Ghuman et al. 2005

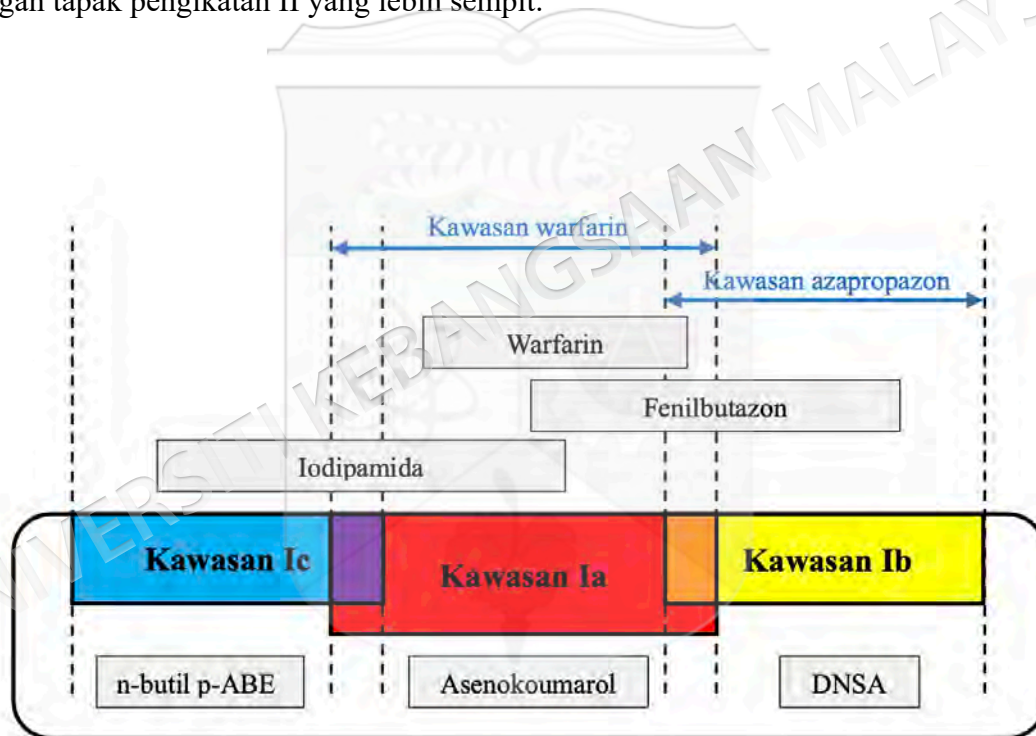
**a. Tapak pengikatan I**

Tapak pengikatan I atau tapak Sudlow I, juga dikenali sebagai tapak pengikatan warfarin yang terdiri daripada enam struktur heliks pada subdomain IIA dan satu gelung-heliks (residu 148–154) yang disumbangkan oleh subdomain IB HSA (Ghuman et al. 2005). Tapak ini mempunyai saku dengan dindingnya diliputi oleh rangkaian hidrofobik dan laluan masuk dengan residu bercas positif. Pintu masuk ke tapak pengikatan I dilingkungi oleh subdomain IIB dan IIIA. Residu asid amino dari subdomain ini (IIB dan IIIA) telah membentuk ruang kecil hadapan untuk pengikatan indometasin dan sebahagian struktur bagi iodipamida, fenilbutazon dan warfarin (Ghuman et al. 2005). Majoriti ligan yang dipercayai mengikat pada tapak ini adalah molekul asid dikarboksilik atau heterosiklik dengan bercas negatif (Rimac et al. 2017).

Bahagian dalam tapak ini bersifat hidrofobik dan dikelilingi oleh residu Trp-214, Leu-219, Phe-223, Leu-238, Leu-260, Ile-264, Ser-287, His-242, Ile-290 dan Ala-291 (Ghuman et al. 2005; Yang, Zhang & Liang 2014). Tapak ini mempunyai saku yang terdiri daripada dua kluster residu berkutub iaitu kluster residu dalam (terletak di bahagian bawah saku) yang melibatkan Tyr-150, His-242 dan Arg-257 dan kluster residu luar (di pintu masuk saku) yang melibatkan Lys-195, Lys-199, Arg-218 dan Arg-222 (Rimac et al. 2017; Yamasaki et al. 2013). Kaviti pengikatan terbesar adalah ruang tengah yang terdiri daripada tiga kompartmen atau sub-ruang berbeza. Sub-ruang hidrofobik kiri dan kanan terletak pada hujung belakang saku yang terbahagi oleh residu Ile-264. Sub-ruang ketiga terkeluar daripada saku hadapan dan ditandakan oleh residu Phe-211, Trp-214, Ala-215, Leu-238 dan sebahagian residu alifatik Lys-199 dan Arg-218 (Ghuman et al. 2005).

Berdasarkan kajian kristalografi, tapak pengikatan ini digambarkan bersaiz besar dan lebih fleksibel berbanding tapak pengikatan II (Yamasaki et al. 2013). Fleksibiliti kawasan tapak ini boleh membenarkan beberapa ligan mengikat serentak, misalnya pengikatan indometasin bersama azapropazon, oksifenbutazon dan fenilbutazon (Yamasaki et al. 2013). Dadah-dadah tapak pengikatan I juga boleh mengikat pada kawasan yang berbeza pada saku pengikatan subdomain IIA dan pada bahagian bersebelahan antara muka

dengan subdomain IB (Ghuman et al. 2005; Zhu et al. 2008). Menurut Yamasaki et al. (1996), tapak I mempunyai tiga kawasan (Ia, Ib dan Ic) yang separa bertindih seperti dalam Rajah 2.8 dan dipersetujui oleh Zhu et al. (2008) berdasarkan kajian kristalografi. Ligan penanda yang efektif dan mengikat kuat adalah asenokoumarol bagi kawasan Ia, dansil- L -asparagin (DNSA) bagi kawasan Ib dan n-butyl p-ABE bagi kawasan Ic (Yamasaki et al. 1996; Zhu et al. 2008). Beberapa kajian menunjukkan kawasan Ia dan Ib sebagai kawasan pengikatan warfarin dan azapropazon (Kragh-Hansen 1983; Kragh-Hansen 1985; Kragh-Hansen 2016). Secara keseluruhannya, tapak pengikatan I yang luas ini juga boleh membenarkan pengikatan banyak dadah dalam masa yang sama, berbeza dengan tapak pengikatan II yang lebih sempit.



Rajah 2.8 Lokasi kawasan Ia, Ib dan Ic di tapak pengikatan I HSA dengan ligan penanda tapak I. Garisan putus-putus mewakili sempadan antara tiga kawasan termasuklah kawasan bertindih. Kawasan warfarin dan azapropazon juga ditunjukkan dalam rajah.

Sumber : Adaptasi daripada Yamasaki et al. 1996

## **b. Tapak pengikatan II**

Tapak pengikatan II atau tapak Sudlow II, juga dikenali sebagai indol-benzodiazepin yang terdiri daripada enam struktur heliks di subdomain IIIA (Ghuman et al. 2005). Kriteria tapak pengikatan ini adalah sama dengan tapak I, di mana dinding poket ini terbentuk oleh rantai hidrofobik dan laluan masuk tapak ini daripada residu bercas positif. Pintu masuk tapak ini lebih terdedah kepada pelarut kerana subdomain IIIA berputar lebih jauh dari pintu masuk (Ghuman et al. 2005). Kebanyakan ligan mengikat tapak ini selalunya adalah asid karbosiklik alifatik atau aromatik dengan kumpulan berasid bercas negatif pada satu hujung yang dipisahkan oleh bahagian hidrofobik ditengah molekul (Rimac et al. 2017; Yamasaki et al. 2013).

Ciri-ciri tapak ini adalah lebih kecil, sempit, lebih selektif dan kurang fleksibel berbanding tapak I (Filip et al. 2013). Maka, tidak hairanlah jika molekul bersaiz besar seperti bilirubin, hemin dan hematin tidak boleh mengedok pada tapak ini (Kragh-Hansen, Chuang & Otagiri 2002). Kawasan tapak yang kecil ini sepadan dengan bahagian tengah saku pengikatan tapak I dan hanya terdapat satu sub-kompartmen iaitu ruang kecil hidrofobik sebelah kanan belakang. Sub-ruang sebelah kiri tapak ini terhapus oleh kehadiran residu Tyr-411, yang berlaku pada subdomain IIIA pada posisi sepadan dengan residu Leu-219 pada subdomain IIA. Berdasarkan kristalografi HSA, tapak II ini sebahagian besarnya adalah kaviti hidrofobik dengan satu tompok berkutub dominan berhampiran pintu masuk saku yang berpusat pada residu Tyr-411, tetapi juga melibatkan Lys-414, Ser-489 dan Arg-410. Pembentukan titian garam antara Arg-348–Glu-450 dan Arg-485–Glu-383 menandakan hujung penutup poket. Residu Arg-410 dan Lys-414 dari tapak II merupakan dua residu asid amino yang setara dengan tompokan berkutub pada tapak I yang melibatkan residu Arg-218 dan Arg-222 (Ghuman et al. 2005).

Walaupun tapak ini agak kecil, namun kebolehsuaian tapak ini membuktikan kemampuannya untuk berinteraksi dengan dua molekul asid lemak rantai panjang pada tapak pengikatan asid lemak FA3 dan FA4 atau berinteraksi dengan satu molekul tiroksin (Al-Harhi et al. 2019). Ekor metilena asid lemak terikat pada FA3 menduduki kawasan tak

berkutub, manakala kumpulan karboksilat asid terikat pada FA4 berkemungkinan berinteraksi dengan tompokan berkutub tapak ini (Al-Harhi et al. 2019). Pengikatan asid lemak pada FA3 tidak menunjukkan sebarang interaksi dengan tompokan berkutub yang berpusat pada residu Tyr-411. Bukan itu sahaja, pengikatan asid lemak pada tapak pengikatan II membawa kepada alterasi struktur HSA yang ketara, melibatkan putaran domain I dan III berbanding dengan domain II (Yamasaki et al. 2017). Sebaliknya, pengikatan dadah di tapak I dan II hanya membawa kepada perubahan konformasi setempat. Walaupun begitu, kesan struktur yang kecil dan kehadiran tapak pengikatan tambahan membawa kepada interaksi alosterik antara tapak I dan II (Al-Harhi et al. 2019). Contoh interaksi alosterik yang melibatkan ligan tapak I dan II yang telah dilaporkan adalah warfarin–diazepam, pinoxicam–diazepam, tenoxicam–diazepam, aspirin–amlodipine dan dansyl-L-asparagine (DNSA)–ibuprofen atau diazepam (Yamasaki et al. 2017).

Seterusnya, tapak pengikatan II juga kelihatan kurang fleksibel kerana ligan mengikat pada tapak ini sering menunjukkan stereoselektiviti dan sangat dipengaruhi oleh pengubahsuaian struktur ligan dengan kumpulan yang agak kecil. Contohnya, (R)-ibuprofen mengikat tapak II dengan afiniti pengikatan 2.3 kali lebih tinggi berbanding (S)-enantiomer (Yamasaki et al. 2013). Selain itu, afiniti pengikatan (S)-karbenisilin adalah 4 kali lebih kuat daripada (R)-enantiomer (Itoh et al. 1996), manakala (R)-sulbenisilin adalah 2.3 kali daripada (S)-sulbenisilin (Tsuda et al. 2001). Contoh lainnya, diazepam juga mengikat pada tapak ini tetapi bukan pemflorinan diazepam iaitu flunitrazepam (Filip et al. 2013). Oleh itu, meskipun tapak ini boleh diakses oleh pelbagai ligan, namun ia lebih terhad berbanding tapak I. Fakta ini menunjukkan bahawa walaupun tapak ini mempunyai kemampuan untuk mengikat pelbagai ligan yang berbeza, namun fleksibiliti yang terhad telah menghalang pengikatan ligan bersaiz besar atau lebih kompleks.

### c. **Tapak Pengikatan III**

Subdomain IB HSA yang terdiri daripada empat struktur heliks telah dianggap sebagai tapak pengikatan III kerana menjadi pilihan bagi pengikatan sebahagian dadah farmaseutikal dan sebatian bioaktif (Zsila 2013; Zunszain et al. 2008). Tidak hanya itu,

eksperimen kristalografi juga menunjukkan bahawa terdapat celah besar pada subdomain IB yang merupakan lokasi tapak pengikatan sekunder untuk beberapa sebatian tertentu (Zunszain et al. 2008). Tapak ini lebih cenderung untuk pengikatan bahan endogenus dan sebatian heterosiklik (Zsila 2013).

Penyusunan semula residu-residu berbes pada pintu masuk tapak ini merupakan aspek penting yang menjelaskan fleksibiliti tapak ini. Fenomena ini telah memungkinkan interaksi pelbagai ligan yang berkutub pada tapak ini (Zunszain et al. 2008). Tapak ini juga diliputi oleh beberapa residu asid amino hidrofobik (Ile-142, Leu-135, Leu-139, Ala-158, Phe-134, Met-123 dan Phe-165) dan residu berkutub (Tyr-138 dan Tyr-161). Struktur saku pengikatan subdomain IB berbentuk “L” disebabkan oleh susunan  $\pi-\pi$  antara gelang aromatik bagi residu Tyr-138 dan Tyr-161 (Ling et al. 2018; Zsila 2013). Interaksi dengan beberapa ligan seperti rantai asid lemak atau hemin pada saku ini telah membuka susunan Tyr. Setiap residu Tyr ini diputar hampir  $90^\circ$  bertentangan dan seterusnya saku ini menjadi bentuk “D”. Saku baru berbentuk “D” ini dapat membenarkan sepenuhnya gegelang satah porfirin hemin. Ekor metilen asid lemak mengikat pada lengkung saku di sekitar dinding belakang dan ini meninggalkan ruang yang mencukupi untuk pengikatan bersama dengan ubat seperti indometasin dan asid triiodobenzoik (Zunszain et al. 2008). Walau bagaimanapun, terdapat juga beberapa ligan lain seperti asid fusidik dan bilirubin yang tidak mempengaruhi susunan  $\pi-\pi$  ini (Ling et al. 2018).

Lebih kurang 60 sebatian bioaktif dengan kepelbagaian struktur (asid, neutral, bes) telah menunjukkan afiniti tinggi pada tapak pengikatan ini (Zsila 2013). Tapak pengikatan III ini merupakan tapak pengikatan primer bagi asid fusidik, bilirubin dan hemin dan ketiga-tiganya mengikat pada lokasi yang sama (Yamasaki et al. 2013; Zsila 2013). Subdomain IB juga dikenalpasti sebagai tapak pengikatan utama bagi anestetik setempat, lidokaina. Ia juga berfungsi sebagai tapak pengikatan sekunder bagi beberapa dadah penting seperti azapropazon, warfarin, indometasin, asid iofenosik, asid triiodobenzoik dan 3'-azida-3'-deoksitimidina (AZT) (Ghuman et al. 2005). Pengikatan dimerik oleh idarubicin dan metil oren pada tapak III ini telah menekankan ciri-ciri fleksibiliti tapak ini (Zsila 2013). Keseluruhannya, kehadiran pelbagai jenis dadah ini menggambarkan bahawa

tapak ini mempunyai struktur yang berkebolehan menampung pelbagai sebatian dengan sifat kimia yang berbeza-beza.

#### **d. Lain-lain tapak**

Selain dari tapak pengikatan utama (tapak pengikatan I, II dan III), terdapat juga tapak pengikatan lain yang menjadi tumpuan iaitu tapak pengikatan pada subdomain IA, IIB dan IIIB) serta tapak pengikatan logam.

Analisis kristalografi menunjukkan bahawa dadah propofol mengikat pada kedua-dua subdomain IIIA dan IIIB (Ghuman et al. 2005). Tapak pengikatan sekunder untuk ibuprofen dan diflunisal terletak di antara subdomain IIA dan IIB, manakala tapak pengikatan untuk oksifenilbutazon terletak di dalam subdomain IIIB (Yamasaki et al. 2013). Di subdomain IIIB, kumpulan karboksil asid lemak berinteraksi dengan Lys-525, dibantu oleh Tyr-401 (Kragh-Hansen 2016). Dadah anti-bakteria imipenem berinteraksi dengan residu Arg-410 dan Try-411 pada subdomain IIIA dapat mempengaruhi perubahan aktiviti esterase HSA dan boleh mengikat lemah di antara celah subdomain IIA-IIB (Rehman, Shamsi & Khan 2014). Dadah anestetik, halotana merupakan dadah tapak II juga berkebolehan untuk mengedok di permukaan luar antara subdomain IIA dan IIB (Ghuman et al. 2005). Sebatian anestetik lainnya, iaitu 1-kloro-1,2,2-trifluorosiklobutana berinteraksi dengan residu Trp-214 dan mengikat di celah antara subdomain IA dan IIA (Eckenhoff et al. 2000). Bagi HSA bebas asid lemak mempunyai empat tapak pengikatan untuk hormon tiroksin iaitu tiroksin 1 pada subdomain IIA, tiroksin 2 pada subdomain IIIA, tiroksin 3 dan tiroksin 4 terletak dalam subdomain IIIB (Petitpas et al. 2003). Pembentukan tapak pengikatan tiroksin yang baru di subdomain IB juga diperhatikan dalam kajian kristalografi bagi HSA dalam kehadiran miristat (Ha & Bhagavan 2013).

Disamping itu, derivatif busillamina, D-penisilamina, captopril dan asid etakrinik terikat kepada HSA melalui interaksi dengan residu Cys-34 di subdomain IA yang berada di celah permukaan protein (Rimac et al. 2017). Lokasi ini juga menjadi tapak pengikatan ion logam ion emas(I), ion platina(II), ion perak(I), ion merkuri(II)) dan juga dadah yang mengandungi logam seperti auranofin (Talib, Beck & Ralph 2006). Terdapat juga tapak

pengikatan logam lain yang terletak pada hujung terminal-N (dikenali tapak terminal-N) yang meliputi residu Asp-1, Ala-2, His-3 dan Lys-4. Tapak ini berafiniti tinggi terhadap ion logam tertentu seperti ion tembaga(II), ion kobalt(II), kuprum(II) dan ion nikel(II) (Sadler, Tucker & Viles 1994). Selain itu, terdapat juga tapak pengikatan multi-logam utama atau dikenali tapak pengikatan kadmium A (MSB-A) yang terletak di kawasan antara domain I/II dan dikelilingi oleh FA1, FA2 dan FA7 (Mothes & Faller 2007). Tapak ini berafiniti tinggi terhadap ion kadmium (II) dengan nilai  $K_d$  iaitu  $5.0 \times 10^{-6}$  M dan bertindak sebagai tapak pengikatan sekunder bagi Cu (II) (Al-Harhi et al. 2019). Seterusnya, tapak logam keempat iaitu tapak kadmium B (MBS-B) mempunyai afiniti pengikatan yang serupa dengan Cd(II) seperti tapak MSB-A (Mothes & Faller 2007). Ia juga dianggap sebagai tapak pengikatan utama untuk ion mangan(II) dan ion kobalt(II) (Al-Harhi et al. 2019). Kesan salingan tapak-tapak pengikatan logam disebabkan sifat pengikatan yang berbeza telah mencadangkan kemungkinan berlakunya interaksi antara bahagian protein yang berkaitan.

Tambahan lagi, terdapat kajian yang menyatakan bahawa sebatian opioid propofol mempunyai dua tapak pengikatan di subdomain IIIA dan IIIB HSA (Zhou et al. 2012). Sebaliknya, sebatian opioid seperti morfin dan naloxone berkongsi tapak pengikatan di antara subdomain IA dan IIA, yang turut merupakan salah satu tapak utama bagi pengikatan halotana (HAL7) dan FA2. Naloxone juga mempunyai tapak pengikatan tersendiri dalam HSA yang terletak berhampiran Trp-214 di subdomain IIA, dan tapak ini diketahui turut mengikat halotana (HAL6) (Zhou et al. 2012). Menariknya, beberapa sebatian terbitan indol yang mempunyai persamaan struktur dengan MTG turut mengikat pada tapak yang sama (Alves et al. 2021; Pawar, Kalalbandi & Jaldappagari 2018). Tambahan pula, tapak III di subdomain IB HSA juga dikenalpasti sebagai tapak pengikatan bagi beberapa sebatian indol lain yang bertindak sebagai agen psikotropik, termasuklah dietilamida asid lisergik, dimetiltriptamina dan psilosibin (Khastar et al. 2020). Maka, pengikatan MTG pada HSA dijangkakan untuk berinteraksi pada tapak yang sama dengan dadah opioid atau sebatian terbitan indol.

Oleh itu, pentingnya untuk mengkaji serta menganalisis dengan teliti tapak pengikatan pada HSA oleh pelbagai jenis dadah dan sebatian bioaktif. Ini adalah langkah yang penting dalam memahami farmakokinetik yang relevan dengan mekanisme pengikatan, termasuk tindak balas sesaran yang mungkin berlaku antara interaksi dadah-dadah yang berbeza.

## 2.6 GLIKOPROTEIN ASID- $\alpha_1$

Glikoprotein asid- $\alpha_1$  (AAG), atau juga dikenali sebagai orosomuroid (ORM), merupakan sejenis protein plasma yang terglukosilasi dan berasal daripada subfamili lipocalin (Luo et al. 2015; Schmidt, Gonzalez & Derendorf 2010). Kepekatan AAG dalam plasma orang dewasa sihat adalah sekitar 2–3% daripada jumlah keseluruhan protein plasma, iaitu sekitar 12.5–25  $\mu\text{M}$  (0.05 to 0.1 g/dL), yang jauh lebih rendah daripada HSA (Huang & Ung 2013). Kebanyakan protein AAG disintesis (sekitar 10 mg/kg/hari) di dalam hati dan dirembeskan ke dalam sistem peredaran darah. AAG juga disintesis dan dirembeskan oleh organ lain seperti jantung, paru-paru dan perut (Ruiz 2021). AAG mempunyai separuh hayat sekurang-kurangnya 2–3 hari atau sekitar 5 hari (Bteich 2019). AAG juga merupakan glikoprotein kecil fasa akut yang bercas negatif dan sangat larut di dalam air dan pelarut organik berkutub lainnya. Titik isoelektriknya berbeza-beza antara 2.8 dan 3.8 pada keadaan pH fisiologi (Luo et al. 2015).

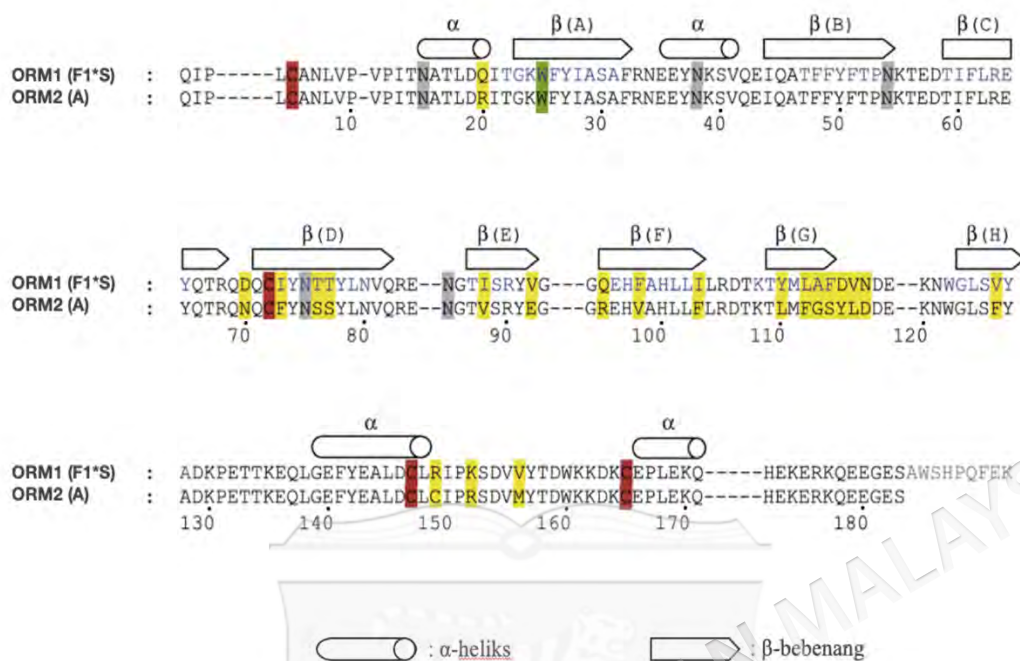
### 2.6.1 Struktur varian polimorfik AAG

Pengekspresan gen AAG berlaku pada kromosom 9 (kedudukan g31–34.1) dan melibatkan tiga gen bersebelahan iaitu AAG-A, AAG-B dan AAG-B'. Ketiga-tiga gen ini memainkan peranan penting dalam mengekodkan protein AAG yang terdapat dalam badan manusia. Gen AAG-A secara khusus mengekodkan tiga varian protein iaitu varian F1, F2 dan S. Manakala, gen AAG-B dan AAG-B' pula bertanggungjawab mengekodkan varian A (Schönfeld et al. 2008). Secara kolektifnya, varian F1, F2 dan S dirujuk sebagai F1\*S yang dikodkan oleh gen ORM1 (AAG-A) yang berbeza lebih kurang lima asid amino (Schönfeld et al. 2008). Varian F1 mempunyai Gln-38 dan Val-174, varian F2 mempunyai

Gln-38 dan Met-174 dan varian S mempunyai Arg-38 dan Val-174 (Schönfeld et al. 2008; Taguchi et al. 2013).

Bagi varian A pula, ia dikodkan oleh gen ORM2 (AAG-B/B') yang mempunyai lebih kurang 22 tapak penggantian asid amino. Kemudiannya, ia ditranslasikan kepada 21 penggantian asid amino di antara varian F1\*S dan A (Huang et al. 2012), yang membawa kepada perbezaan struktur di antara kedua-dua varian tersebut. Secara terperinci, perbezaan antara varian F1 dan S adalah lebih kecil, dengan hanya mempunyai satu penggantian asid amino Gln/Arg pada kedudukan 20 (Fitos et al. 2012). Protein AAG manusia sebenarnya wujud sebagai campuran varian F1\*S dan A. Di dalam darah manusia, nisbah kemolaran varian F1\*S dan A adalah di antara 3:1 sehingga 2:1 (Nishi et al. 2011), yang menunjukkan bahawa varian F1\*S adalah lebih dominan berbanding varian A. Taburan varian F1 dan S meliputi seluruh dunia, namun varian F2 adalah lebih terhad dan ditemui terutamanya di kalangan orang Eropah dan Asia Barat (Taguchi et al. 2013). Ini menunjukkan variasi genetik antara populasi yang berkemungkinan mempengaruhi respons terhadap dadah dan risiko penyakit dalam bidang perubatan.

Jumlah jujukan polipeptida AAG natif adalah 201 asid amino dengan kehadiran peptida isyarat merembes terminal-N sebanyak 18 residu (Taguchi et al. 2013). Maka, struktur matang protein AAG manusia adalah sebanyak 183 asid amino. Perbezaan residu asid amino bagi AAG varian F1\*S dan varian A iaitu sebanyak 21 residu asid amino, yang diterangkan dalam Rajah 2.9. Protein AAG adalah rangkaian polipeptida tunggal dengan berat molekulnya sekitar 41–43 kDa, yang mengandungi 59% asid amino (183 residu) dan kandungan karbohidrat yang tinggi iaitu melebihi 41% daripada berat keseluruhan molekul (Bteich 2019). Kandungan karbohidrat ini termasuklah asid sialik (12%), heksosa neutral (14%), heksosamina (14%) dan fruktosa (1%). Komposisi asid sialik pada AAG menyumbang kepada cas negatif permukaan protein (Luo et al. 2015). Terdapat lima struktur heteropolisakarida (rantai N-glikan) mengikat secara kovalen dengan lima residu Asn (Asn-15, Asn-38, Asn-54, Asn-75 dan Asn-85) yang membentuk tapak N-glikosilasi (Bteich 2019).

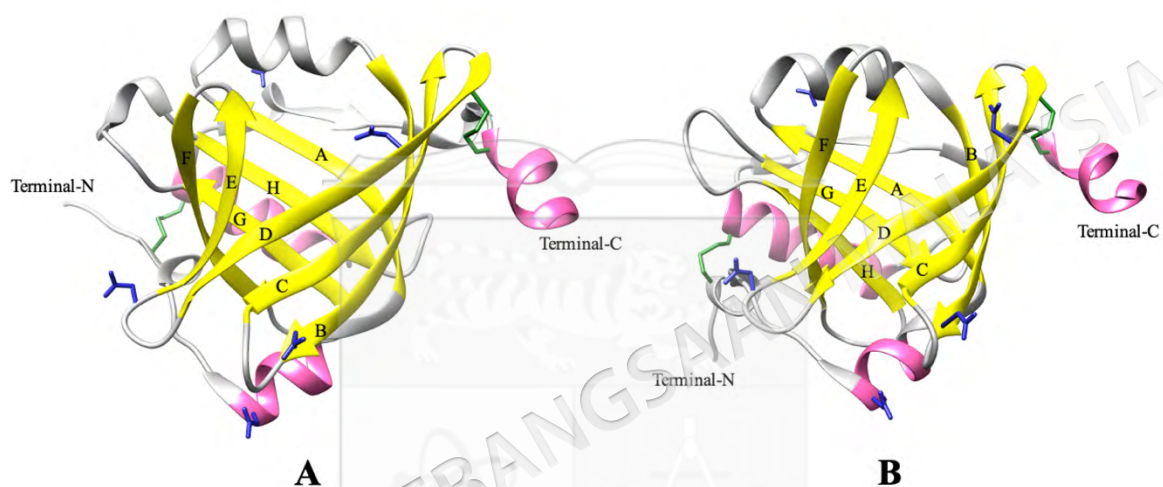


Rajah 2.9 Penjajaran jujukan dan superposisi struktur bagi kedua-dua isoform varian AAG manusia. Anotasi struktur sekunder adalah berpadanan dengan struktur kristal AAG varian F1\*S. Residu Cys yang terlibat dalam pembentukan titian dwisulfida diwakili warna merah, residu Trp-25 yang terbenam dalam saku hidrofobik protein diwakili warna hijau dan tapak glikosilasi diwakili warna kelabu. Manakala, perbezaan residu asid amino bagi ORM1 (varian F1\*S) dan ORM2 (varian A) diwakili warna kuning.

Sumber : Adaptasi daripada Schönfeld et al. 2008

Struktur varian F1\*S dan A mengandungi lipatan lipocalin yang terdiri daripada 8 bebenang  $\beta$  (Rajah 2.10). Komposisi  $\beta$ -bebenang bagi varian F1\*S adalah sepadan dengan residu asid amino 24–32, 45–54, 58–68, 71–82, 86–92, 95–103, 109–114 dan 123–128 (Schönfeld et al. 2008). Manakala, varian A terdiri daripada  $\beta$ -bebenang yang sepadan dengan residu asid amino 23–32, 44–54, 59–68, 71–82, 87–92, 95–102, 109–114 dan 123–128 (Nishi et al. 2011). Struktur sekunder  $\beta$ -bebenang ini diapit oleh struktur heliks- $\alpha$  yang melibatkan beberapa residu polipeptida iaitu 15–20, 35–43, 135–148, dan 165–172 (Schönfeld et al. 2008) bagi varian F1\*S, manakala 15–21, 35–42, 135–147, dan 166–171 bagi varian

A (Nishi et al. 2011). Terdapat 4 gelung yang memainkan peranan menghubungkan bebenang-bebenang  $\beta$  iaitu gelung 1 (A/B), 2 (C/D), 3 (E/F) dan 4 (G/H). Gelung 2 dan 3 adalah agak pendek yang terletak di pintu masuk saku pengikatan dan membentuk selekoh tajam, manakala gelung 1 dan 4 adalah lebih panjang. Tambahan lagi, terdapat kehadiran dua titian dwisulfida yang letak pada kawasan terminal-N (residu Cys-5–Cys-147) dan pada kawasan terminal-C (residu Cys-72–Cys-165) (Schönfeld et al. 2008).



Rajah 2.10 Struktur 3D kristal AAG bagi (A) varian F1\*S (PDB: 3KQ0) dan (B) varian A (PDB: 3APU). Struktur sekunder:  $\beta$ -bebenang (kuning), heliks- $\alpha$  (merah jambu), gelung (kelabu), dua titian dwisulfida (hijau) dan lima rantai N-glikan (biru).

Sumber : Adaptasi daripada Schönfeld et al. 2008

Hasil analisis kristalografi struktur sekunder AAG memperoleh 25.7% kandungan heliks- $\alpha$ , 39.3% lembaran- $\beta$  dan selebihnya struktur gelung sebanyak 35% (Schönfeld et al. 2008). Berbeza dengan hasil yang diperoleh menggunakan spektroskopi Raman dengan anggaran peratusan moiety adalah heliks- $\alpha$ : 15%, lembaran- $\beta$ : 41%,  $\beta$ -turn: 12%, jalur: 8% dan struktur tak tertib: 24% pada pH 7.4 (Luo et al. 2015). Walau bagaimanapun, analisis hasil spektroskopi transformasi Fourier inframerah (FTIR) mendapati 12% struktur heliks- $\alpha$ , 37% lembaran- $\beta$ , 13%  $\beta$ -turn, 15% jalur dan 25% struktur tak tertib (Kopecký et al. 2003). Sementara itu, kajian lain yang menggunakan spektroskopi CD menunjukkan

kandungan protein AAG natif adalah berjumlah 33% heliks- $\alpha$  dan 41.7% lembaran- $\beta$  (AlAjmi et al. 2020). Kajian terbaru menggunakan spektroskopi CD melaporkan kandungan lembaran- $\beta$  adalah 46.3% bagi protein AAG natif (Liu et al. 2024). Perbezaan hasil kajian ini menekankan pentingnya kaedah analisis dan keadaan eksperimen dalam penentuan struktur protein.

### 2.6.2 Fungsi biologi dan peranan patalogi AAG

AAG adalah salah satu protein anti-radang dan dianggap sebagai protein fasa akut yang terlibat dalam pelbagai aktiviti modulasi tindak balas imun (Bi et al. 2017; Hochepped et al. 2003; Ruiz 2021). Pengekspresan gen AAG diperaturkan oleh pelbagai sitokin pro-radang (IL-1 dan IL-6), kemokines (IL-8), faktor nekrosis tumor-alfa (TNF- $\alpha$ ) dan glukokortikoid (Smith & Waters 2019; Tesseromatis et al. 2011). Aruhan pengekspresan ORM1 dalam monosit manusia oleh vitamin D dapat menghalang pengekspresan sitokin pro-radang (TNF- $\alpha$ , IL-6) dan menggalakkan pengekspresan penanda penyahaktifan (MMP9, CD163) (Gemelli et al. 2013). Begitu juga, AAG dilaporkan mengaktifkan tapak jalan pengisyaratan TLR4/CD14 dalam kedua-dua sel THP-1 terbeza bak makrofaj dan sel mononuklear darah periferal dengan rangsangan keradangan. Ini seterusnya membawa kepada ekspresi terkawal CD163 melalui aruhan IL-6 dan IL-10 serta perencatan proses keradangan (Komori et al. 2012). AAG boleh mengganggu fungsi sitokin dengan mengaruh perembesan reseptor TNF- $\alpha$  dan antagonis IL-1 (Luo et al. 2015).

AAG telah terbukti secara khusus melindungi tikus daripada kejutan maut yang disebabkan oleh TNF- $\alpha$  dan keradangan hepatitis yang disebabkan oleh TNF- $\alpha$  bersama galaktosamina *in vivo* (Luo et al. 2015). AAG juga boleh mengaruh pelepasan TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 dan IL-12 larut oleh leukosit mononuklear secara sistemik dan setempat (Hochepped et al. 2003). AAG berfungsi menghalang olengan (*rolling*), lekatan serta pemindahan leukosit *in vivo*, dan bertindak balas terhadap kemotaksis secara *in vitro* (Mestriner et al. 2007). Ia juga terlibat dalam pengurangan pemindahan neutrofil dan meningkatkan kerentanan terhadap sepsis pada tikus diabetes (Spiller et al. 2012). AAG juga dianggap peramal prognostik yang baik bagi pesakit sepsis berbanding indikator lain seperti

pengiraan sel darah putih, kadar protein C-reaktif (CRP) dan laktat (Hsiao et al. 2019). Di klinik, paras peredaran AAG yang lebih rendah didapati pada pesakit kejutan septik berbanding dengan pesakit tanpa kejutan. Juga, paras AAG secara tidak langsung dikaitkan dengan kematian 96 jam pada individu dengan sepsis teruk (Luo et al. 2015). Maka, penerangan dari beberapa kajian ini mencadangkan AAG berfungsi sebagai agen imunomodulasi dalam tidak balas fasa akut dengan mengawal aktiviti sel imun, seperti makrofaj dan neutrofil, dan mengawal pengeluaran sitokin keradangan.

Selain itu, AAG diklasifikasikan sebagai protein fasa akut, bermakna berlaku peningkatan plasma AAG dalam darah disebabkan tindak balas terhadap keradangan, jangkitan, barah dan kecederaan tisu (Smith & Waters 2019). Kepekatan AAG boleh meningkat sehingga 10 kali ganda berbanding dengan paras normal, bergantung kepada keparahan keadaan penyakit. Terdapat beberapa kajian melaporkan tentang peningkatan tahap AAG pada pesakit dengan karsinoma hepatoselular, kolangioselular, kolorektal dan gastrik (Pitekova et al. 2019; Yildirim et al. 2007). Purata kepekatan AAG dalam serum dan asites pesakit kanser perut dengan karsinomatosis peritoneal adalah lebih tinggi daripada purata kepekatan AAG yang diperhatikan dalam serum individu sihat (Ohbatake et al. 2016). Selain itu, Ayyub et al. (2016) telah mendapati peningkatan tahap AAG pada pesakit-pesakit yang mengalami karsinoma sel skuamosa (2.93 g/L) dan adenokarsinoma (2.39 g/L) berbanding dengan kumpulan kawalan yang sihat (0.83 g/L). Peningkatan ketara AAG dapat diperhatikan dalam kanser payudara dengan pengekspresan AAG yang tinggi dalam sel-sel dan tisu kanser payudara, dan lebih tinggi pada peringkat IV berbanding peringkat III dan II (Qiong & Yin 2022). Oleh demikian, prognosis kanser kelihatan berkait rapat dengan tahap AAG dan pemantauan tahap AAG dapat memberikan maklumat berharga tentang keparahan penyakit, respons terhadap rawatan dan ramalan awal.

Selain itu, AAG juga melindungi daripada jangkitan bakteria dan virus. Struktur polimer AAG menghalang pertumbuhan beberapa strain virus influenza dan parasit malaria (Israili & Dayton 2001). AAG juga menghalang replikasi rotavirus dengan bertindak langsung terhadap partikel virus ini (Superti et al. 1993). Pra-penyuntikan AAG pada tikus telah memberikan kesan perlindungan dan meningkatkan kelangsungan hidup terhadap

infeksi bakteri Gram-negatif *Klebsiella pneumoniae* (Hochepped et al. 2000) dan *Bacillus anthracis* (Shemyakin et al. 2005). Kajian terbaru menunjukkan, paras AAG meningkat dalam pesakit COVID-19 yang teruk dan berkolerasi dengan IL-6 dan protein C-reaktif (Mestriner et al. 2024). Tahap AAG yang tinggi dalam serum disebabkan jangkitan telah digunakan sebagai parameter perencatan virus influenza dari oseltamivir dan ribavirin (Sidwell et al. 2001), dan perencat HIV iaitu atazanavir (Barrail-Tran et al. 2010).

Fungsi biologi AAG yang lain adalah membantu dalam mengekalkan struktur dan fungsi kebolehtelapan kapilari melalui selektiviti cas anion di permukaan endotelium yang penting untuk kestabilan sel darah merah (Haraldsson & Rippe 1987). Plasma AAG dari haiwan (bovin dan kanin) juga berinteraksi pada permukaan eritrosit ini yang menyumbang kestabilan membran sel darah merah (Matsumoto et al. 2003). Ini juga disokong oleh kajian yang mencadangkan AAG memodulasikan sel endotelial mikrovaskular dengan meningkatkan cas negatif permukaan lapisan glikokaliks (Yuan et al. 2010). AAG juga membantu dalam melancarkan laluan eritrosit melalui kapilari dan memberikan kesan perlindungan yang jelas terhadap hemolisis semasa proses penapisan dilakukan (Maeda et al. 1984). Pada kepekatan normal, AAG menunjukkan aktiviti antioksidan yang kuat dengan melindungi eritrosit daripada tekanan oksidatif yang disebabkan oleh hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) (Matsumoto et al. 2003). Oleh itu, peningkatan AAG dalam serum patologi membantu laluan eritrosit melalui kapilari, menstabilkan membran, dan melindungi daripada tekanan oksidatif.

Secara keseluruhan, peningkatan tahap AAG adalah mekanisme pertahanan tubuh yang menyumbang kepada tindak balas fasa akut, pemulihan tisu, dan homeostasis. Fungsi protein AAG dipengaruhi oleh interaksinya dengan sebatian endogenus dan eksogenus. Perubahan kepekatan protein plasma AAG dalam keadaan patologi boleh mempengaruhi kepekatan dadah bebas tanpa mengubah jumlah kepekatan dadah dalam plasma. AAG adalah penting untuk pengikatan dadah berbes dan neutral yang menyumbang kepada pembangunan dadah.

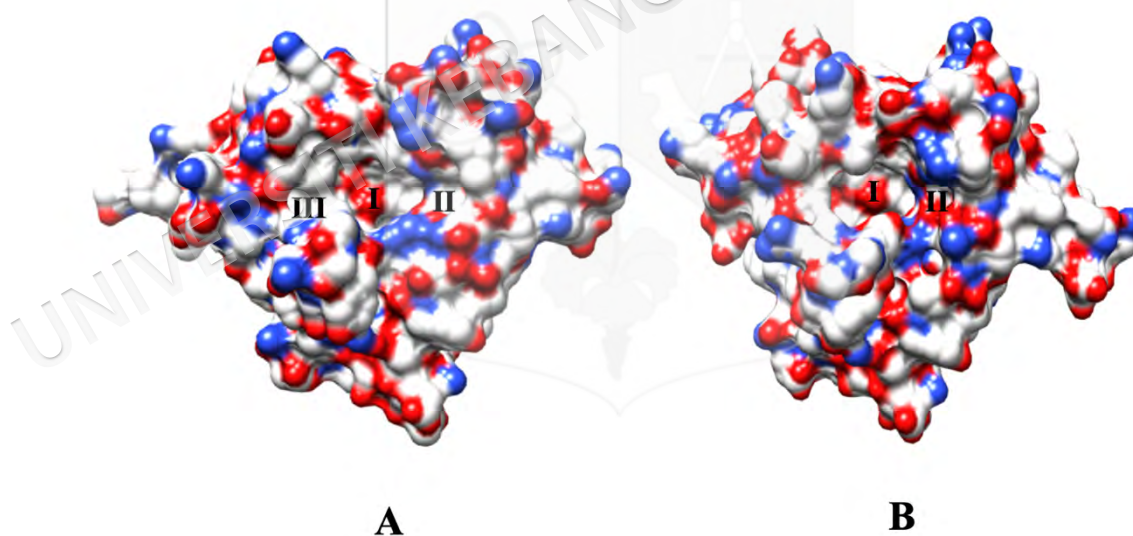
### 2.6.3 Pengikatan dadah pada AAG

Protein AAG mempunyai tujuh tapak pengikatan dengan ciri-ciri yang berbeza, namun hanya satu tapak pengikatan yang terletak di dalam struktur  $\beta$ -barel protein ini yang telah dibuktikan berperanan penting bagi pengikatan dan pengangkutan dadah dalam sistem peredaran manusia (Owczarzy et al. 2023). Pengikatan dadah pada tapak pengikatan AAG ini adalah tepu dan rentan kepada aktiviti sesaran yang diaruh oleh dadah-dadah lain (Huang & Ung 2013).

AAG merupakan protein pengangkut bagi pelbagai dadah lipofilik yang neutral dan berbes (Fournier, Medjoubi-N & Porquet 2000). Misalnya, dipiridamol, klorpromazina, vinblastin, lidokaina, verapamil, imatinib, tamoxifen dan propranolol iaitu sebatian dadah berbes, manakala diazepam dan karbamazepin iaitu sebatian dadah neutral menunjukkan pengikatan kuat pada protein AAG (Luo et al. 2015; Smith & Waters 2019). Walaupun kebanyakan dadah berasid mengikat pada HSA, namun terdapat pengecualian bagi beberapa dadah termasuklah warfarin, fenobarbital, asid retinoik dan asenokoumarol (Ascenzi et al. 2014). Dadah-dadah berasid ini mengikat kuat pada AAG walaupun kepekatan protein AAG jauh lebih rendah berbanding HSA. Terdapat juga dadah asid lain yang mengikat lemah pada protein AAG seperti benoxaprofen, indometasin dan itanoxon (Fournier, Medjoubi-N & Porquet 2000; Tesseromatis et al. 2011).

Meskipun kedua-dua varian mempamerkan konfigurasi struktur tertier yang serupa, namun gambaran dekat struktur ini menunjukkan perbezaan topologi yang ketara antara struktur kavitinya (Nishi et al. 2011; Schönfeld et al. 2008). Perbezaan varian genetik menunjukkan perbezaan keafinan pengikatan dan selektiviti oleh pelbagai jenis ligan terhadap kedua-dua varian protein ini. Pengikatan dadah pada varian F1\*S mempunyai korelasi yang ketara dengan kelipofilikannya, tetapi tidak bagi varian A (Hanada 2017). AAG juga dikenali sebagai protein berasid dengan cas elektrik positif disebabkan kehadiran residu asid amino Arg-68 dan Arg-90 pada sekitar pintu masuk tapak pengikatan bagi varian F1\*S dan A. Diameter pintu masuk ini dianggarkan berukuran diameter 8–12 Å (Ascenzi et al. 2014; Schönfeld et al. 2008). Variasi ini mempengaruhi keafinan pengikatan ligan dan seterusnya memberikan kesan jelas dalam bioperubatan.

Ciri-ciri saku pengikatan bagi varian F1\*S adalah lebih luas berbanding varian A kerana mempunyai tiga lobus (Rajah 2.11A). Varian A adalah lebih sempit dan hanya mempunyai dua lobus seperti ditunjukkan dalam Rajah 2.11B (Ascenzi et al. 2014; Nishi et al. 2011). Lobus I adalah lebih besar daripada dua lobus lainnya dan merupakan subkompartmen tidak berkutub utama dalam saku pengikatan yang menggalakkan pengikatan dadah hidrofobik (Nishi et al. 2011). Penglibatan residu asid amino seperti Tyr-27, Phe-51, Leu-62, Leu-79, Ile-88, Ala-99, Leu-101, Leu-102, Tyr-110, Leu-112 dan Tyr-127 bertanggungjawab untuk pembentukan lobus I. Manakala, lobus II dan III adalah lebih kecil dan bercas negatif yang berpusat dari lobus I (Schönfeld et al. 2008). Kedua-dua lobus kecil bercas negatif disebabkan oleh kehadiran residu asid amino berasid iaitu Glu-64 (di dalam lobus II) dan Asp-115 (di dalam lobus III). Lobus II dilapisi oleh residu asid amino Phe-49, Glu-64, Gln-66, Ile-73, dan Arg-90 manakala lobus III dilapisi oleh residu asid amino Phe-32, Ala-113, Phe-114, Asp-115, dan Ser-125 (AlAjmi et al. 2020).



Rajah 2.11 Perbandingan saku pengikatan dadah di dalam varian F1\*S dan AAAG. (A) dan (B) masing-masing menunjukkan permukaan elektrostatik varian F1\*S dan A. Kawasan cas negatif dan cas positif diwakili warna merah dan biru.

Sumber : Nishi et al. 2011

Perbezaan struktur kedua-dua varian ini dengan lebih 20 asid amino penggantian menunjukkan selektiviti dalam pengikatan dadah pada protein ini. Misalnya, asid amino Phe-49 dan Phe-112 pada varian A AAG berinteraksi dengan gegelang aromatik struktur dadah disopiramida dan amitriptilina dengan afiniti pengikatan yang tinggi (Nishi et al. 2011). Kehadiran residu Leu-112 pada varian F1\*S, tetapi tiada pada varian A, didapati mempengaruhi pengikatan disopiramida dan amitriplina pada varian F1\*S yang menjadikannya pengikatan lemah (Nishi et al. 2011). Bahagian atas pintu masuk tapak pengikatan varian A terdapat residu Glu-92 yang diperlukan untuk pengikatan propafenon (Nishi et al. 2009). Pengikatan dadah pada AAG varian A mempamerkan selektiviti pengikatan yang lebih terhad dan afiniti pengikatan dadah yang lebih tinggi. Sebaliknya, varian F1\*S menunjukkan selektiviti pengikatan dadah yang lebih luas dengan keseluruhan afiniti pengikatan dadah yang lebih rendah (Huang et al. 2012). Kepentingan perbezaan selektiviti pengikatan antara varian F1\*S dan A berhubung dengan geometri yang unik dan tenaga pengikatan dadah (Nishi et al. 2011).

Pengelasan dadah berdasarkan kecenderungan pengikatan sama ada pada varian F1\*S atau A adalah disenaraikan di dalam Jadual 2.4. Menariknya, beberapa bahan antidepresan seperti amitriptilina, imipramina, dan nortriptilina dan sebatian opioid seperti metadon berafiniti tinggi dengan protein AAG varian A (Huang & Ung 2013). Sebaliknya, terdapat juga beberapa dadah seperti progesteron, flunitrazepam, propranolol dan klorpromazina yang berafiniti tinggi kepada kedua-dua varian ini (Ascenzi et al. 2014). Bukan hanya sebatian opioid, tetapi juga sebatian terbitan indol iaitu staurosporin berinteraksi pada tapak pengikatan di tengah protein AAG (Landin et al. 2021). Oleh kerana MTG bertindak sebagai agonis separa pada reseptor opioid, pengikatannya kepada AAG mungkin mempunyai persamaan dengan metadon dan boleh mempengaruhi sifat farmakokinetiknya.

Justeru itu, penelitian dan analisis yang mendalam mengenai lokasi tapak pengikatan pilihan serta asid amino residu yang terlibat dalam pengkompleksannya dengan protein bagi calon sebatian terapeutik adalah penting. Hal ini dapat memberikan pemahaman yang lebih baik mengenai interaksi dadah-dadah serta potensinya untuk

mengikat pada tapak pengikatan yang sama, yang bermanfaat dalam konteks farmakokinetik dan keberkesanan klinikal.

Jadual 2.4 Senarai, kegunaan dan nilai pemalar asosiasi dadah yang berafiniti tinggi pada AAG varian F1\*S dan A

Dadah	Kegunaan	$K_a (M^{-1})$
<b>Varian F1*S</b>		
Amlodipina	Merawat tekanan darah tinggi (hipertensi)	$1.40 \times 10^5$
Binedalina	Merawat kemurungan	$4.62 \times 10^6$
Dipiridamol	Untuk mengelakkan tromboembolik selepas pembedahan.	$2.27 \times 10^6$
Imatinib	Merawat pelbagai jenis barah	$1.70 \times 10^6$
Misfepriston	Untuk kegunaan pengguguran secara perubatan	$2.06 \times 10^6$
Tamsulosin	Merawat gejala prostat yang membesar	$6.30 \times 10^5$
Warfarin	Merawat dan mencegah pembekuan darah	$1.92 \times 10^6$
<b>Varian A</b>		
Amitriptilina	Merawat kemurungan	$3.40 \times 10^6$
Deramsiklana	Merawat kecelaruan keresahan	$2.00 \times 10^6$
Disopiramida	Merawat kelainan irama jantung	$4.40 \times 10^6$
Imipramina	Merawat kemurungan	$9.40 \times 10^5$
Metadon	Merawat ketagihan opioid	$9.90 \times 10^5$
Nortriptilina	Merawat sakit saraf	$9.00 \times 10^5$
Propafenon	Merawat irama jantung yang tidak teratur	$4.18 \times 10^6$

Sumber : Adaptasi daripada Huang & Ung (2013)

## **2.7 IMPLIKASI DAN APLIKASI KLINIKAL BERKAITAN PENGIKATAN PROTEIN PLASMA**

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pengikatan protein plasma iaitu faktor fisiologi, patologi dan perubahan teraruh dadah dalam pengikatan protein (Deb et al. 2018). Di dalam keadaan penyakit tertentu, HSA dan AAG menunjukkan perubahan tahap serum secara ketara dan seterusnya mempengaruhi fraksi terikat dan fraksi bebas dadah. Oleh itu, pengikatan dadah kepada protein plasma boleh dipengaruhi oleh kehadiran sebatian-sebatian lain (eksogenus, endogenus) atau oleh perubahan konformasi protein dalam keadaan patologi tertentu.

### **2.7.1 Eksplorasi penyesaran dan interaksi dadah–dadah pada HSA dan AAG**

Interaksi dadah–dadah menyebabkan penyesaran kompetitif apabila dadah bersaing untuk tapak pengikatan yang sama, atau penyesaran alosterik apabila pengikatan dadah pada tapak lain menyebabkan perubahan konformasi protein (Yamasaki et al. 2013). Penyesaran dadah dari protein plasma boleh menyebabkan perubahan mendadak dalam kepekatan dadah tak terikat yang boleh mempengaruhi kesan farmakologi dadah.

Beberapa penyelidikan tentang interaksi dadah–dadah telah menjelaskan penyesaran dadah yang terikat kepada albumin oleh dadah lain. Misalnya, pesakit sindrom nefrotik menunjukkan tindak balas lemah terhadap furosemida, tetapi kesannya dapat ditingkatkan dengan bukolom melalui penyesaran kompetitif pada tapak I HSA (Nishio et al. 2008). Bukolom juga berpotensi meningkatkan aktiviti warfarin apabila digunakan secara konkomitan sebagai agen anti-pembekuan (Osawa et al. 2005). Fenilbutazon boleh menyasarkan warfarin dari HSA, manakala kehadiran tolbutamida, indometasin, dan beberapa ubat lain boleh menghalang pengikatannya (Fasano et al. 2005). Kajian lain juga menunjukkan bahawa penyesaran kompetitif oleh nabumeton meningkatkan kesan analgesik diklofenak dalam pesakit rheumatoid arthritis (Setoguchi et al. 2013). Bukan itu sahaja, kehadiran asid lemak bebas pada tapak Sudlow II boleh mengganggu pengikatan beberapa dadah seperti thiamilal, diazepam dan flurbiprofen (Kragh-Hansen, Chuang &

Otagiri 2002). Tambahan lagi, terapi gabungan seperti gabungan flurbiprofen axetil dan emulsi lipid juga boleh meningkatkan fraksi dadah bebas dan memberikan kesan analgesik yang lebih kuat, terutama bagi pesakit kanser (Ogata et al. 2008).

Berbeza daripada HSA, pengikatan dadah kepada AAG adalah tepu dan lebih terdedah kepada penyesaran oleh dadah lain disebabkan kepekatannya yang agak rendah dalam plasma. AAG hanya mempunyai satu saku pengikatan yang luas dan fleksibel yang terletak pada tengah protein ini (Owczarzy et al. 2023). Penyesaran kompetitif terhadap tapak pengikatan tunggal AAG telah diperhatikan di antara pelbagai jenis dadah. Contohnya, nortriptilin dan bupivakaina boleh menyesarkan lidokaina, yang seterusnya menyebabkan peningkatan fraksi bebas lidokaina (Huang & Ung 2013; Israili & Dayton 2001). Sebaliknya, beberapa dadah berafiniti tinggi seperti amitriptilina dan propranolol tidak memberi kesan ketara terhadap penyesaran lidokaina (Goolkasian et al. 1983). Piperina turut menyesarkan propranolol, lidokaina, dan disopiramida, dan menyebabkan fraksi bebas dadah-dadah ini meningkat (Dubey et al. 2017). Selain itu, penyesaran imatinib oleh klindamisin telah meningkatkan fraksi bebas imatinib (Gambacorti-Passerini et al. 2003). Tambahan juga, penyesaran dadah antifolat dari tapak pengikatan AAG oleh dipiridamol telah meningkatkan fraksi dadah bebas tersebut, menyebabkan kesan sitotoksik antifolat dalam rawatan barah dipertingkatkan (Curtin, Newell & Harris 1989). Namun, penyesaran juga boleh meningkatkan risiko ketoksikan sistemik. Contohnya, lidokaina disesarkan oleh disopiramida menghasilkan fraksi bebas lebih tinggi daripada jangkaan yang berpotensi menyebabkan kesan sampingan (Bonde et al. 1987).

Natijahnya, kajian yang mendalam tentang penyesaran dadah pada tapak pengikatan HSA dan AAG mempunyai kelebihan untuk meningkatkan keberkesanan klinikal dan mengurangkan risiko kesan sampingan yang tidak diingini. Oleh itu, interaksi dadah-dadah terutamanya apabila berlaku persaingan untuk tapak pengikatan yang sama pada protein plasma perlu dipertimbangkan. Ini seterusnya dapat mengembangkan pendekatan rawatan yang lebih tepat dan terarah, dengan tujuan meningkatkan kesejahteraan pesakit.

### 2.7.2 Implikasi pengikatan dadah pada HSA dan AAG dalam keadaan patologi

Perubahan pengikatan dadah pada HSA dan AAG dalam keadaan patologi boleh terjadi disebabkan beberapa faktor iaitu perubahan kepekatan protein plasma, perubahan konfigurasi protein dan penyesaran oleh bahan endogen yang terkumpul (Yamasaki et al. 2013). Kepekatan HSA dan AAG dalam keadaan patologi boleh menyebabkan perubahan pengikatan dadah kepada protein plasma dan fraksi dadah bebas yang akhirnya mempengaruhi kesan terapeutik.

Bagi HSA, kepekataannya dalam individu dewasa sihat adalah sekitar  $42.0 \pm 3.5$  g/L, namun boleh menurun sehingga 7–25 g/L dalam keadaan penyakit (Peters 1996). Hipoalbuminemia boleh mengakibatkan peratusan fraksi dadah bebas meningkat terutamanya dalam pesakit ginjal dan hati. Sebagai contoh, fraksi bebas fenitoin dan klofibrat lebih tinggi dalam pesakit sindrom nefrotik individu sihat (Gugler & Azanoff 1976). Bagi pesakit diabetes, tahap HSA terglikasi meningkat hingga 30% boleh mengganggu pengikatan dadah seperti liraglutida, sulfisoksazol, warfarin, dan ketoprofen (Baraka-Vidot et al. 2012; Ruiz-Cabello & Erill 1984; Soudahome et al. 2018). Selain itu, modifikasi oksidatif pada pesakit hemodialisis boleh mengurangkan pengikatan dadah di tapak II HSA (Mera et al. 2005), sementara karbamilasi albumin dalam kegagalan ginjal kronik disebabkan peningkatan uremia boleh mengurangkan pengikatan dadah di tapak I HSA tanpa menjejaskan DZM di tapak II (Calvo et al. 1982; Reidenberg & Drayer 1984). Selain itu, perubahan konfigurasi struktur HSA boleh disebabkan oleh glikolasi, modifikasi oksidatif dan modifikasi kimia, yang seterusnya mempengaruhi kapasiti pengikatan dadah pada protein ini.

Peningkatan fraksi bebas DZM dalam pesakit diabetes dikaitkan oleh kesan penyesaran daripada asid lemak bebas (Ruiz-Cabello & Erill 1984). Kenaikan fraksi dadah bebas dalam pesakit kegagalan ginjal kronik dan uremia pula adalah disebabkan penyesaran berbalik perencat endogenus seperti toksin uremik atau asid lemak di dalam plasma (Calvo, Carlos & Erill 1982; Reidenberg & Drayer 1984). Penyesaran dadah oleh CMPF (3-karboksi-4-metil-5-propil-2-furanpronoik) pada tapak I di subdomain IIA dan asid hipurik

pada tapak II di subdomain IIIA telah menyebabkan fraksi dadah terikat dadah berkurang dalam pesakit uremia (Sakai, Takadate & Otagiri 1995; Takamura, Maruyama & Otagiri 1997). Dalam pesakit hati, peningkatan bilirubin (BR) bersaing dengan fenitoin untuk pengikatan albumin menyebabkan peningkatan fraksi bebas dadah (Yamasaki et al. 2013). Manakala, asid salisilik menghalang pengikatan DZM pada tapak II albumin dalam pesakit sirosis, yang dijadikan penanda klinikal keterukan penyakit hati (Klammt et al. 2008; Kober et al. 1978).

Bagi AAG, kepekatannya adalah jauh lebih rendah daripada albumin, namun ia boleh meningkat secara dramatik dalam keadaan keradangan, jangkitan, barah dan kecederaan tisu sistemik (Bi et al. 2017). Keadaan keradangan seperti reumatoid arthritis dan penyakit Crohn telah menunjukkan peningkatan dalam kepekatan AAG yang telah mempengaruhi fraksi dadah bebas metadon dan klozapin (Man et al. 2019; Rodriguez et al. 2004). Di dalam model haiwan arthritis teraruh adjuvan, peningkatan AAG menjejaskan farmakokinetik propranolol disebabkan oleh peningkatan fraksi terikatnya pada protein plasma (Kawase et al. 2013). Peningkatan AAG dalam pesakit SLE pula telah mengurangkan fraksi bebas aprindina, disopiramida, imatinib, dan mepivakaina sebanyak 22–55% (Beeram et al. 2021).

Modifikasi rantai glikan AAG turut mempengaruhi fraksi dadah bebas dan keafinan pengikatan dadah bagi mepivakaina dan disopiramida (Beeram et al. 2021). Selain itu, model tikus dijangkiti *Staphylococcus aureus* menunjukkan peningkatan AAG pada hari keempat. Ini menyebabkan perubahan farmakokinetik, seperti peningkatan AUC propranolol disebabkan oleh kepekatan dadah bebas yang lebih tinggi (Boyle et al. 2021). Peningkatan AAG dalam pesakit kanser boleh mengurangkan fraksi bebas dadah anti-kanser, dan akhirnya menjejaskan keberkesanannya. Contohnya, docetaxel dipengaruhi oleh tahap AAG dalam pesakit barah (Kenmotsu et al. 2017). AAG juga mengurangkan kepekatan intrasel imatinib sehingga 10 kali ganda dalam leukemia myeloid kronik, namun kehadiran klindamisin dapat memulihkannya (Gambacorti-Passerini et al. 2003). Selain itu, AAG tinggi dalam pesakit kanser gastrik menurunkan fraksi bebas paclitaxel, namun

pemberian bersama eritromisin boleh memulihkan keberkesanannya (Ohbatake et al. 2016).

Kesimpulannya, perubahan kepekatan HSA dan AAG dalam keadaan patologi memberi kesan ketara terhadap profil farmakokinetik pelbagai dadah. Ini mengakibatkan perubahan pengikatan dadah kepada protein, fraksi dadah bebas, dan akhirnya mempengaruhi kesan terapeutik dadah. Oleh itu, pemantauan dan penyesuaian dos dadah yang sesuai mungkin penting untuk memastikan keberkesanan terapi dan mengurangkan risiko kesan sampingan dalam pesakit yang mengalami keadaan patologi tersebut.



## **BAB III**

### **BAHAN DAN KAEDAH**

#### **3.1 BAHAN**

##### **3.1.1 Protein plasma, sebatian psikoaktif dan ligan penanda**

Protein plasma yang digunakan ialah HSA (tanpa asid lemak dan ketulenan  $\geq 99\%$ ) dan AAG (ketulenan  $\geq 99\%$ ) yang telah diperoleh dari Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Sebatian psikoaktif MTG (ketulenan  $\geq 95\%$ ) dibekalkan oleh Biosynth AG (Compton, UK). Kesemua ligan penanda bagi eksperimen sesaran dadah kompetitif iaitu fenilbutazon (PB, ketulenan  $\geq 98\%$ ), ketoprofen (KTN, ketulenan  $\geq 98\%$ ), hemin (HMN, daripada porsin, ketulenan  $\geq 96\%$ ) dan bilirubin (BR, ketulenan  $\geq 98\%$ ) juga diperoleh dari Sigma-Aldrich. Kebenaran memiliki bahan psikoaktif (MTG) bagi tujuan penyelidikan telah diperoleh dari Bahagian Penguatkuasaan Farmasi, Kementerian Kesihatan Malaysia, seperti ditunjukkan pada Lampiran 1.

##### **3.1.2 Bahan kimia, pelarut organik dan air tulen**

Bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini merangkumi natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), pelet natrium hidroksida (NaOH), asid etilenadiaminatetraasetik (EDTA) yang dibekalkan oleh Merck KGaA (Darmstadt, Jerman). Penimbal standard untuk pelarasan pH (pH 4, pH 7 dan pH 10) dan pelarut organik etanol dan metanol dibekalkan oleh Chemiz Shd Bhd (Shah Alam, Malaysia). Air tulen jenis II yang dihasilkan oleh sistem penulenan air Milli-Q (Merck Millipore) telah digunakan dalam kajian ini. Penapisan lanjutan air ini dilakukan dengan menapis semula menggunakan sistem penapisan Laboport® Mini Laboratory Pumps. Membran turasan

PVDF Durapore® bersaiz pori sebesar 0.1  $\mu\text{m}$  yang digunakan untuk penapisan ini telah dibekalkan oleh Merck Millipore. Semua bahan kimia termasuklah pelarut organik dan larutan penaras pH adalah bergred analitikal dan digunakan tanpa penulenan lanjutan.

### 3.2 PENYEDIAAN SAMPEL

Penyediaan larutan stok protein plasma (2 mg/mL) dilakukan dengan melarutkan sejumlah serbuk kristal protein dalam larutan penimbal natrium fosfat 10 mM pada pH 7.4. Larutan stok protein disimpan pada 4 °C dan digunakan dalam masa dua minggu. Larutan stok MTG sebanyak 1 mg/mL disediakan dengan melarutkan sejumlah serbuk MTG dalam pelarut metanol. Ligan penanda PB dan KTN disediakan dengan menggunakan etanol untuk menyediakan larutan stok (1 mg/mL). Sementara itu, penyediaan larutan stok HMN (1 mg/mL) dilakukan dengan melarutkan serbuk HMN dalam larutan NaOH 0.5 M. Pencairan larutan stok kemudian dilakukan menggunakan larutan penimbal natrium fosfat untuk mendapatkan kepekatan yang dikehendaki. Larutan HMN telah disediakan segar dan digunakan dalam tempoh 2 jam sahaja kerana HMN mudah mengalami pengoksidaan dan degradasi. Disebabkan kefotopekaan HMN, maka pendedahan cahaya perlu diminimumkan bagi mengelakkan fotodegradasi.

Penentuan kepekatan protein plasma dan ligan penanda dikenalpasti secara spektrofotometrik dengan menggunakan pemalar molar ekstinksi tertentu. Persamaan hukum Beer Lambert (3.1) digunakan untuk pengiraan kepekatan sampel seperti:

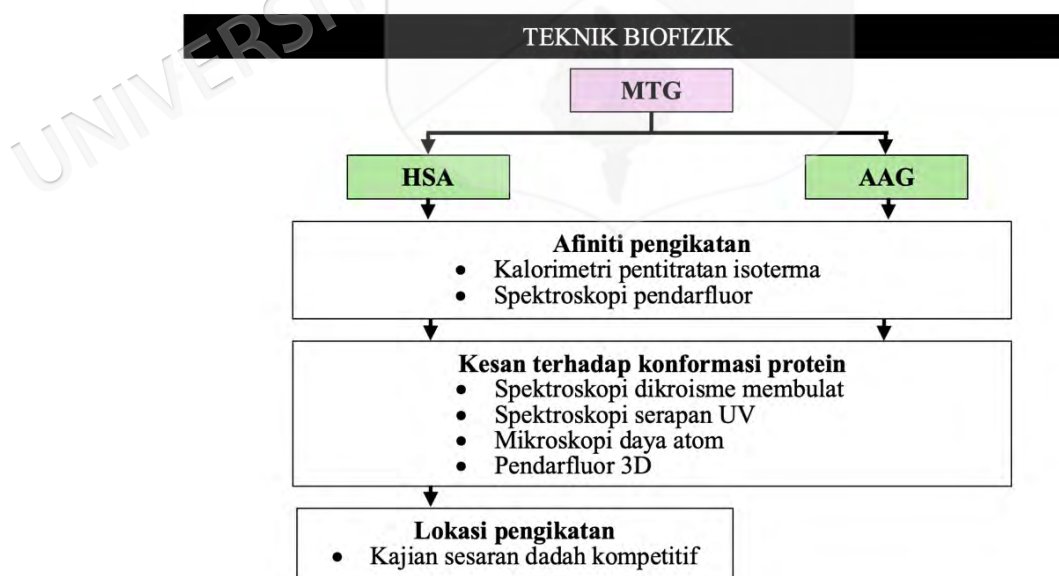
$$A = \epsilon l C \quad \dots(3.1)$$

Di mana  $A$  mewakili bacaan serapan sampel,  $\epsilon$  mewakili pemalar molar ekstinksi ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $l$  mewakili panjang lintasan kuvet (cm) dan  $C$  mewakili kepekatan sampel (M). Pengukuran serapan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific Nano Drop OneC Microvolume (Waltham, Massachusetts, USA). Pemalar molar ekstinksi protein adalah 35 219  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bagi HSA pada 280 nm (Pace et al. 1995) dan 8.93 (g/100 mL) $^{-1}\text{cm}^{-1}$  bagi AAG pada 278 nm (Zsila & Iwao 2007). Manakala, pemalar molar ekstinksi bagi ligan penanda adalah 15 450  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pada 254 nm bagi KTN (Pereira et al. 2007), 21 050  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pada 265 nm bagi PB (Lovering & Black 1974) dan 58 440

$M^{-1}cm^{-1}$  pada 385 nm bagi HMN (Sonavane et al. 2017). Justifikasi penggunaan persamaan ini adalah untuk memastikan jumlah dan kepekatan sampel dengan tepat.

### 3.3 PENDEKATAN BIOFIZIK

Teknik biofizik adalah kaedah kajian yang menggunakan prinsip-prinsip fizik untuk menyelidik sistem biologi bagi memahami aspek struktur dan fungsi biomolekul. Di dalam kajian ini, pelbagai teknik biofizik termasuklah spektroskopi pendarfluor, spektroskopi serapan, kalorimetri pentitratan isoterma (ITC), mikroskopi daya atom (AFM) dan spektroskopi dikroisme membulat (CD) telah diaplikasikan untuk menyiasat secara komprehensif mekanisme interaksi MTG dengan HSA dan AAG (Rajah 3.1). Eksperimen yang menggunakan alat spektroskopi pendarfluor, spektroskopi CD dan spektroskopi penyerapan telah dijalankan bertempat di Institut Genom dan Vaksin Malaysia, Jalan Bangi, 43000 Kajang, Selangor. Manakala, eksperimen ITC telah dilakukan di Fakulti Sains, Universiti Malaya, 50603 Wilayah Persekutuan, Kuala Lumpur. Sampel untuk eksperimen AFM pula telah dihantar ke Makmal Berpusat i-CRIM, Pusat Pengurusan Makmal Alam dan Fizikal UKM, Kompleks Penyelidikan UKM, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43 600 Bangi, Selangor, untuk analisis.



Rajah 3.1 Carta alir kajian yang melibatkan teknik biofizik

### 3.3.1 Spektroskopi pendarfluor

Spektroskopi pendarfluor merupakan sejenis spektroskopi elektromagnetik yang digunakan untuk pengukuran spektrum pancaran yang dihasilkan oleh fluorofor setelah pengujian pada panjang gelombang tertentu (Zacharioudaki, Fitis & Kotti 2022). Fluorofor ialah sebatian kimia berpendarfluor yang biasanya mengandungi gabungan kumpulan aromatik atau satah atau siklik, termasuk pirena, perilena, imidazola, dan karbazola, dan boleh memancarkan semula cahaya selepas diberi cahaya pengujian (Uslu, Tümay & Yeşilot 2022). Perubahan spektrum pendarfluor sesuatu makromolekul iaitu sama ada menurun atau meningkat boleh dianggap sebagai indikator yang berlakunya interaksi di antara protein dengan molekul pelindap (D'Agostino et al. 2019).

Teknik spektroskopi pendarfluor telah digunakan untuk menerangkan pengikatan HSA dan AAG dengan memerhatikan perubahan intensiti pendarfluor disebabkan interaksinya dengan MTG. Pengukuran intensiti pendarfluor dijalankan menggunakan spektrofluorometer Agilent Cary Eclipse (Santa Clara, CA, USA) yang dilengkapi dengan pancaran lampu xenon (80 Hz). Suhu ditetapkan pada 25 °C menggunakan pemegang sel tunggal Peltier termostat dan bekas air PCB 150. Penetapan lebar lekahan bagi pengujian dan pancaran adalah pada 10 nm dan kelajuan imbasan ialah 600 nm min<sup>-1</sup>. Manakala, sensitiviti tiub pemfotoganda (PMT) ditetapkan pada 600 V. Pengukuran spektrum pancaran bagi larutan protein plasma (3 µM) tanpa dan dengan kehadiran MTG (0–100 µM) direkodkan pada julat panjang gelombang pancaran di antara 320–440 nm dengan pengujian pada 295 nm. Pengukuran spektrum adalah menggunakan kuvet fluorometer kuartza berisipadu 3.5 mL dengan panjang lintasan 1 cm. Semua data spektrum yang diperoleh telah melalui proses perataan menggunakan algoritma Savitzky–Golay dengan lebar konvolusi sebanyak 25. Pengukuran sampel pengosong yang mengandungi ligan bebas dan penimbal dilakukan juga dengan cara yang sama.

Seterusnya, analisis data pendarfluor dilakukan untuk menentukan nilai pemalar asosiasi ( $K_a$ ) bagi kompleks MTG–HSA dan MTG–AAG, diandaikan dengan pembentukan kompleks tepu 1:1. Sebelum itu, pembetulan data intensiti pendarfluor perlulah dilakukan

(seperti dijelaskan pada subtopik 3.3.2) untuk meminimumkan kesan turasan dalaman yang boleh mengganggu kesahihan data ini (Fonin et al. 2014). Kemudian, data pendarfluor yang telah dibetulkan dianalisis menggunakan persamaan (3.2) iaitu :

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_C} = \frac{[P]_t + [L]_a + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_a + K_d)^2 - 4 * [P]_t * [L]_a}}{2 * [P]_t} \quad \dots(3.2)$$

di mana  $F$  mewakili pendarfluor yang diukur,  $F_0$  mewakili pendarfluor tanpa ligan,  $F_C$  mewakili pendarfluor bagi protein mencapai ketepuan,  $K_d$  mewakili pemalar disosiasi,  $[P]_t$  mewakili kepekatan protein jumlah dan  $[L]_a$  mewakili kepekatan ligan yang ditambah. Persamaan ini telah digunakan kerana ianya tidak memerlukan andaian mengenai pendarfluor protein sisa dan kepekatan ligan terikat atau bebas (van de Weert & Stella 2011). Lazimnya, ia digunakan bagi mengkaji perubahan pendarfluor bagi pembentukan kompleks 1:1 (Beckett 2011). Nilai  $K_d$  ( $K_a = 1/K_d$ ) telah diperolehi daripada Perisian GraphPad Prism versi 9.3.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) menggunakan pepadanan lengkung tak linear (model pengikatan satu tapak spesifik). Keafinan interaksi di antara MTG dengan HSA dan AAG dapat dinilai berdasarkan nilai  $K_a$  yang diperolehi.

Bagi eksperimen pendarfluor 3D, sampel 3  $\mu\text{M}$  protein, 6  $\mu\text{M}$  MTG dan kompleks MTG–protein (nisbah molar 1:2) diperolehi dengan menggunakan julat panjang gelombang pengujaan di antara 220–350 nm dan spektrum pancaran di antara 220–500 nm dengan jurang panjang gelombang sebanyak 10 nm. Semua parameter lain dikekalkan tanpa perubahan, seperti yang telah dinyatakan sebelum ini. Kesemua graf bagi spektrum pendarfluor 3D dihasilkan menggunakan perisian OriginPro 2022 versi 9.9.0.225 (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA). Eksperimen ini dijalankan bertujuan untuk memahami perubahan mikrop persekitaran fluorofor protein HSA dan AAG setelah pengikatan MTG.

### 3.3.2 Spektrofotokopi serapan ultraungu-tampak

Spektroskopi penyerapan ultraungu-tampak (UV-Vis) adalah suatu teknik analisis kimia yang menggunakan penyerapan cahaya ultraviolet (UV) dan tampak (Vis) oleh suatu bahan untuk memberikan maklumat mengenai komposisi struktur dan kepekatan molekul-

molekul tersebut. Teknik ini dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dwipancaran (Shimadzu UV-1900) yang dilengkapi sepasang kuvet kuartza 10 mm. Disebabkan kesan turasan dalaman, maka pembetulan data intensiti pendarfluor dilakukan menggunakan persamaan (3.3) seperti :

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} 10^{\left(\frac{A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}}{2}\right)} \quad \dots(3.3)$$

Di mana  $F_{\text{corr}}$  dan  $F_{\text{obs}}$  adalah data intensiti pendarfluor yang telah dibetulkan dan diukur.  $A_{\text{ex}}$  dan  $A_{\text{em}}$  adalah nilai perubahan serapan disebabkan penambahan ligan pada panjang gelombang pengujaan dan pancaran. Untuk pembetulan ini, spektrum serapan bagi 3  $\mu\text{M}$  HSA tanpa dan dengan kehadiran MTG yang berjulat dari 10 hingga 100  $\mu\text{M}$  telah direkodkan. Spektrum serapan bagi 3  $\mu\text{M}$  AAG tanpa dan dengan kehadiran MTG (0.5–20  $\mu\text{M}$ ) juga direkodkan. Eksperimen ini dilakukan dengan jumlah keseluruhan setiap sampel sebanyak 3 mL pada suhu 25 °C dan melibatkan julat panjang gelombang dari 295 sehingga 440 nm.

Selain itu, eksperimen serapan menggunakan mesin yang sama telah dilakukan untuk mengesahkan pengkompleksan protein–ligan berdasarkan perbezaan spektrum serapan di antara larutan campuran (protein–ligan) dengan jumlah penambahan spektrum serapan protein bebas dan ligan bebas (protein+ligan). Oleh itu, spektrum serapan bagi 20  $\mu\text{M}$  HSA dan 20  $\mu\text{M}$  AAG telah direkodkan tanpa dan dengan kehadiran MTG (6, 12 dan 20  $\mu\text{M}$ ). Pengukuran spektrum serapan ini direkodkan pada julat panjang gelombang dari 240 hingga 320 nm. Selain itu, spektrum serapan larutan MTG bebas pada kepekatan yang setara diperolehi dalam julat panjang gelombang yang sama.

### 3.3.3 Kalorimetri pentitratan isoterma

Kalorimetri pentitratan isoterma (ITC) merupakan teknik analitik fizikal yang melibatkan pengukuran perubahan haba semasa tindak balas biokimia seperti pembentukan kompleks protein–ligan (Srivastava & Yadav 2019). ITC adalah pendekatan universal untuk menentukan tingkah laku kinetik makromolekul yang menyediakan maklumat parameter pengikatan dan termodinamik, yang diperolehi melalui hanya satu set eksperimen lengkap.

Kaedah ini telah dijalankan untuk mengesahkan hasil yang diperoleh daripada eksperimen spektroskopi pendarfluor terhadap interaksi MTG dengan kedua-dua protein plasma. Kaedah ini dijalankan menggunakan mikrokalorimeter Nano ITC (TA Instruments, Newcastle, DE, USA) pada suhu 25 °C. Larutan penimbal natrium fosfat 10 mM, MTG dan protein (HSA dan AAG) dinyahgas dengan vakum selama 15 minit sebelum pentitratan dilakukan. Setelah itu, sel rujukan diisi dengan air ternyahion, manakala sel sampel diisi dengan 200  $\mu$ L larutan protein. Eksperimen pentitratan melibatkan 16 suntikan berturut-turut sebanyak 3  $\mu$ L titran MTG ke dalam sel sampel setiap 200 saat sambil dikacau dengan kelajuan 200 rpm untuk mencapai pencampuran homogen. Ini dilakukan dengan penyuntikan 300  $\mu$ M MTG ke dalam larutan 50  $\mu$ M HSA atau larutan 40  $\mu$ M AAG. Eksperimen kawalan adalah suntikan MTG ke dalam penimbal yang dilakukan dalam keadaan yang sama untuk pembetulan haba pencairan dan haba pencampuran larutan.

Seterusnya, jumlah haba yang dibebaskan semasa setiap suntikan telah dikira dengan mengintegrasikan puncak kadar haba dan diselaraskan dengan eksperimen kawalan menggunakan perisian NanoAnalyze 2.4.1. Data kalorimetri yang diperoleh kemudiannya dianalisis berdasarkan model pengikatan tak bersandar untuk mengenalpasti nilai pemalar asosiasi ( $K_a$ ), stoikiometri ( $n$ ), entalpi ( $\Delta H$ ), entropi ( $\Delta S$ ) dan tenaga bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) (Freyer & Lewis 2008; Srivastava & Yadav 2019).

#### 3.3.4 Mikroskopi daya atom

Mikroskopi daya atom (AFM) merupakan teknik pengimejan untuk memvisualisasikan imej topografi 3D dan butiran struktur sampel yang diperoleh menggunakan kantilever yang mengimbas permukaan dengan resolusi tinggi (subnanometer) (Müller et al. 2021; Pleshakova et al. 2018). Imej topografi yang terhasil boleh dinilai untuk mengetahui sifat permukaan seperti ketinggian, kekasaran dan sifat-sifat mekanikal sesuatu molekul. Dalam kajian ini, AFM mod torehan telah digunakan untuk visualisasi perubahan dalam topografi permukaan molekul protein HSA dan AAG tanpa dan dengan kehadiran MTG. Mod torehan digunakan kerana ia membolehkan pengukuran permukaan sampel mempunyai ketepatan tinggi dan daya yang dikenakan pada sampel adalah minimum yang tidak merosakkan sampel. AFM Model NX-10 (Park Systems, Santa Clara, California, USA)

yang mempunyai kantilever (0.3 mm) dengan pemalar daya 0.32 N/m dan frekuensi resonans pengimejan tipikal 140 kHz, digunakan dalam eksperimen ini. Untuk penyediaan sampel, 30  $\mu$ L larutan protein bebas (1.5  $\mu$ M) dan campuran protein–MTG (1:1) disebarikan pada plat mika dan diinkubasi selama 10 minit pada suhu 25 °C. Kemudian, ia dibasuh dengan air ternyahion untuk menghilangkan molekul yang terikat longgar dari permukaan dan dibiarkan mengering semalaman. Analisis statistik dan topologi dilakukan menggunakan perisian XEI (Park Systems).

### 3.3.5 Spektroskopi dikroisme membulat

Spektroskopi dikroisme membulat (CD) merupakan teknik yang mengukur perbezaan antara penyerapan cahaya terkutub membulat yang berpusing lawan arah jam (ke kiri) dan berpusing mengikut arah jam (ke kanan) oleh molekul khi, yang merujuk kepada sebatian aktif optik (Miles, Janes & Wallace 2021). Hasilnya, isyarat CD positif berlaku apabila penyerapan cahaya terkutub membulat ke kiri lebih tinggi, manakala isyarat CD negatif menerangkan penyerapan ke kanan lebih tinggi (Greenfield 2006). Hasil spektrum CD boleh dimanfaatkan untuk mendapatkan maklumat struktur sekunder dan tertier protein. Kaedah ini sesuai untuk mempelajari struktur protein kerana ikatan peptida bersifat asimetri membenarkan penyerapan cahaya terkutub membulat ke kiri dan kanan secara berbeza.

Perubahan struktur sekunder protein disebabkan oleh pengikatan MTG dinilai berdasarkan spektrum UV–jauh (200–250 nm), manakala bagi struktur tertier pula dinilai berdasarkan spektrum UV–dekat (250–300 nm). Kaedah ini sering digunakan untuk memahami kesan interaksi ligan dengan protein terhadap konformasi protein (Kelly, Jess & Price 2005). Pengukuran spektrum CD dijalankan menggunakan spektropolarimeter J-815 (Jasco, Tokyo, Jepun) dengan ketetapan kelajuan imbasan pada 100 nm min<sup>-1</sup>, tempoh tindak balas pada 1 s dan suhu pada 25 °C. Pengaliran nitrogen pada mesin ini secara berterusan untuk mewujudkan persekitaran lengai bagi menghalang pembentukan ozon yang boleh mengganggu isyarat CD. Setiap spektrum mewakili purata bagi tiga imbasan dan pembetulan data dilakukan dengan menolak data spektrum CD sampel dengan kawalan.

Untuk meneliti kesan penambahan MTG terhadap struktur HSA dan AAG, pengukuran spektrum CD UV-jauh dan UV-dekat telah dilakukan menggunakan kuvet dengan masing-masing panjang lintasan 1 mm dan 10 mm. Profil spektrum CD protein (1  $\mu\text{M}$  MTG bagi UV-jauh, 10  $\mu\text{M}$  MTG bagi UV-dekat) direkod tanpa dan dengan kehadiran MTG (1:1). Sebelum pengukuran spektrum CD, campuran protein–MTG diinkubasi selama 30 minit pada suhu 25 °C untuk memastikan ekuilibrium. Akhirnya, semua spektrum menjalani proses perataan menggunakan kaedah Savitzky–Golay dengan lebar konvolusi sebanyak 25 untuk mengurangkan hingar dalam spektrum. Peratusan komponen-komponen bagi struktur sekunder dianggarkan melalui pelayan web BestSel (<http://bestsel.elte.hu>, Micsonai et al. 2022).

### 3.3.6 Kajian sesaran dadah kompetitif

Kaedah sesaran dadah kompetitif merujuk kepada penilaian mengenai pengikatan dua atau lebih dadah yang bersaing untuk mengikat pada tapak pengikatan yang sama pada reseptor. Dadah berafiniti tinggi dengan pengikatan kuat yang mampu menyesarkan dadah berafiniti rendah dari tapak pengikatan. Penyesaran ini boleh mempengaruhi fraksi dadah bebas yang memberi kesan terhadap dos, efikasi dan profil keselamatan dadah.

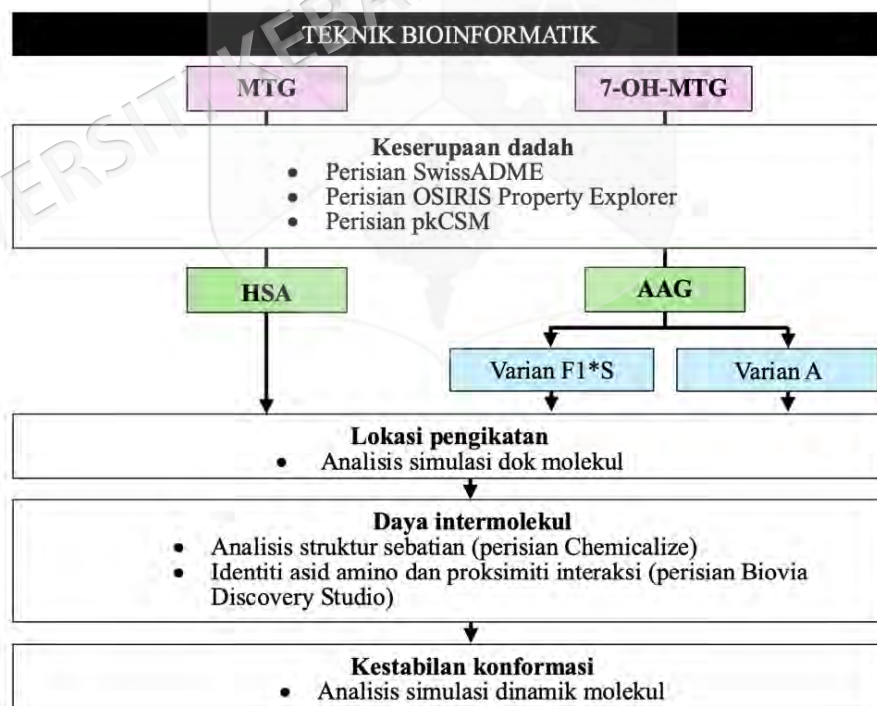
Kaedah sesaran dadah kompetitif ini dijalankan untuk mengenalpasti tapak pengikatan MTG pada HSA menggunakan ligan penanda tertentu (PB bagi tapak I, KTN bagi tapak II, HMN bagi tapak III). Spektroskopi pendarfluor juga digunakan dalam kajian penyesaran ini dan penetapan parameter mesin adalah konsisten dengan yang diterangkan dalam subtopik 3.3.1. Hanya kajian sesaran dadah kompetitif bagi HSA dilakukan disebabkan pelbagai ligan yang berafiniti tinggi pada tapak pengikatan utama HSA telah diketahui. Kesan kehadiran MTG terhadap pengikatan ligan penanda pada tapak pengikatan HSA telah disiasat dengan merekodkan spektrum pendarfluor bagi sampel HSA (3  $\mu\text{M}$ ) dan kompleks ligan penanda–HSA (1:1) dengan kehadiran MTG (5–30  $\mu\text{M}$  dengan selang 5  $\mu\text{M}$ ). Pengukuran spektra dilakukan dalam julat panjang gelombang 300–400 nm, dengan pengujaan pada 295 nm. Kesemua larutan kompleks ligan penanda–HSA telah diinkubasi selama 15 minit sebelum penambahan MTG untuk mencapai ekuilibrium. Seterusnya, ini diikuti dengan inkubasi selama 15 minit lagi sebelum pengukuran spektrum dilakukan.

### 3.3.7 Analisis statistik

Data kuantitatif telah dianalisis secara statistik yang ditunjukkan sebagai  $\text{min} \pm \text{sisihan}$  piawai bagi setiap parameter yang diukur. Setiap nilai ini mewakili min daripada tiga eksperimen yang dijalankan secara tak bersandar dan disertai sisihan piawainya.

## 3.4 PENDEKATAN BIOINFORMATIK

Teknik bioinformatik seperti informatik kimia dan pemodelan molekul melibatkan penggunaan teknologi komputer untuk penyaringan secara maya sebatian dalam masa singkat, mengurangkan kos awal pengenalanpastian dan meningkatkan peluang untuk meneroka calon ubat. Di dalam kajian ini, perisian Chemicalize, SwissADME, OSIRIS Property Explorer dan pkCSM telah digunakan untuk mendapatkan informasi lengkap tentang ciri-ciri fisiokimia dan profil farmakokinetik bagi kedua-dua sebatian psikoaktif ketum ini (Rajah 3.2). Manakala, simulasi dok molekul dan dinamik molekul untuk menilai interaksi antara MTG dan 7-OH-MTG dengan protein plasma (Rajah 3.2).



Rajah 3.2 Carta alir kajian yang melibatkan teknik bioinformatik

### 3.4.1 Analisis struktur molekul bagi MTG dan 7-OH-MTG

Penurunan kadar kejayaan penyaringan agen terapeutik adalah berkaitan dengan ketidaksesuaian antara sifat struktur molekul dan bioketerdapatannya, kegagalan untuk mencapai ciri-ciri farmakokinetik yang sesuai, manifestasi kesan sampingan yang tidak diinginkan, risiko ketoksikan, dan kegagalan untuk mencapai matlamat tindak balas terapeutik dan biologi. Maka, analisis struktur molekul dilakukan menggunakan perisian pengkomputeran seperti Chemicalize (ChemAxon), SwissADME, OSIRIS Property Explorer dan pkCSM.

Perisian Chemicalize (<https://chemicalize.com>, ChemAxon Discovery Toolkit), adalah platform berasaskan web yang direka khas untuk menyediakan maklumat mengenai ciri-ciri struktur kimia sesuatu molekul. Oleh itu, maklumat fisiko-kimia yang diperoleh dari Chemicalize dapat digunakan untuk meramalkan daya intermolekul yang terlibat dalam pembentukan kompleks protein–ligan. Selain itu, perisian SwissADME (<https://www.swissadme.ch/>; Daina, Michielin & Zoete 2017) juga boleh diakses untuk meramalkan pelbagai sifat farmakokinetik dan menilai keserupaan dadah bagi sebatian molekul kecil. Manakala, perisian OSIRIS Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>), boleh menggambarkan struktur kimia dan mengira secara langsung pelbagai sifat yang berkaitan dengan dadah (risiko toksikologi, skor dadah, keserupaan sifat dadah). Seterusnya, perisian pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>; Pires, Blundell & Ascher 2015) adalah laman sesawang yang digunakan untuk penyaringan pelbagai ciri-ciri farmakokinetik (penyerapan, taburan, metabolisme, penyingkiran dan ketoksikan) molekul kecil dengan cepat. Dalam kajian ini, perisian-perisian ini dapat memberikan ramalan awal mengenai kesesuaian sebatian ini (MTG dan 7-OH-MTG) sebagai dadah berdasarkan perbandingan dengan maklumat dadah sedia ada.

### 3.4.2 Analisis dok molekul

Analisis dok molekul dijalankan untuk mengenalpasti orientasi yang optimum bagi sebatian psikotropik ketum apabila berinteraksi dengan HSA dan AAG sebagai reseptor untuk membentuk kompleks stabil dengan keseluruhan tenaga terendah. Simulasi dok

molekul dijalankan menggunakan perisian Autodock 4.2.6 (Morris et al. 2009) dan AutoDockTools 1.5.7 (ADT) (Morris et al. 2009) bagi mengenalpasti lokasi tapak pengikatan sebatian psikoaktif ketum pada protein plasma manusia. Konformer 3D protein bagi HSA (ID PDB: 1BM0), AAG varian F1\*S (ID PDB: 3KQ0) dan AAG varian A (ID PDB: 3APU) natif telah dimuat turun dari Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Struktur 3D MTG (PubChem ID: 3034396) dan 7-OH-MTG (PubChem ID: 44301524) diperoleh daripada PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dalam format SDF dan ditukarkan kepada format PDBQT menggunakan OpenBabel (O'Boyle et al. 2011). Nilai R bagi 1BM0, 3KQ0 dan 3APU disediakan dalam data tambahan entri asal PDB. Pengesahan struktur-struktur ini disokong oleh nilai R masing-masing, dengan 1BM0 mempunyai nilai R-bebas sebanyak 0.292 dan R-kerja sebanyak 0.207; 3KQ0 mempunyai nilai R-bebas sebanyak 0.240 dan R-kerja; dan 3APU mempunyai nilai R-bebas sebanyak 0.232 dan R-kerja sebanyak 0.200. Nilai-nilai ini menunjukkan kesesuaian yang agak tepat antara model dengan data yang diperhatikan.

Untuk prosedur dok molekul, hidrogen tak berkutub telah dicantumkan dan ikatan boleh berputar telah dikenalpasti bagi MTG dan 7-OH-MTG. Struktur protein dikekalkan tegar, manakala ikatan kilasan ligan dibenarkan berorientasi secara bebas. Ligan terikat yang lain dan molekul-molekul air telah disingkirkan daripada struktur protein kerana boleh menjejaskan prosedur simulasi dok molekul ini. Selanjutnya, hidrogen berkutub, unit Kollman atom separa cas dan parameter pensolvatan ditambah pada fail koordinat kristal protein. Fail koordinat 3D rantai A bagi struktur HSA (ID PDB: 1BM0, resolusi 2.5 Å) (Sugio et al. 1999) disimpan dalam fail berasingan selepas molekul air disingkirkan dan digunakan sebagai input untuk ADT. Untuk dok secara rawak, kotak simulasi grid adalah bersaiz  $126 \times 126 \times 126$  Å dengan ruang grid berjumlah 0.681 Å dijana menggunakan AutoGrid untuk meliputi keseluruhan struktur makromolekul ini. Kotak grid pula berpusat pada koordinat  $x = 24.149$ ,  $y = 19.824$ , dan  $z = 24.290$ . Manakala dok secara spesifik yang melibatkan tiga tapak pengikatan HSA utama (subdomain IIA, subdomain IIIA dan subdomain IB) menggunakan kotak simulasi grid  $70 \times 70 \times 70$  Å dengan ruang grid 0.375 Å. Kotak grid berpusat pada koordinat  $x = 35.26$ ,  $y = 32.41$ , dan  $z = 36.46$  untuk tapak pengikatan I (subdomain IIA),  $x = 14.42$ ,  $y = 23.55$ , dan  $z = 23.31$  untuk tapak pengikatan

II (subdomain IIIA), dan  $x = 42.45$ ,  $y = 24.47$ , dan  $z = 15.28$  untuk tapak pengikatan III (subdomain IB).

Bagi AAG, struktur kristal varian F1\*S (ID PDB: 3KQ0, resolusi 1.8 Å) (Schönfeld et al. 2008) dan varian A (ID PDB: 3APU, resolusi 2.1 Å) (Nishi et al. 2011) telah dimuat turun dan digunakan sebagai reseptor dok. Ligan tambahan yang asalnya terikat pada struktur protein (tetraetilena glikol ( $C_8H_{18}O_5$ ) bagi 3APU; ion klorida ( $Cl^-$ ) dan (2R)-2,3-dihidroksipropil asetat ( $C_5H_{10}O_4$ ) bagi 3KQ0) telah disingkirkan. Hanya koordinat atom rantai A bagi 3APU telah disimpan dalam fail berasingan dan digunakan sebagai input untuk ADT. Untuk dok secara rawak, dua kotak simulasi grid  $126 \times 126 \times 126$  Å telah digunakan dengan ruang grid 0.408 Å, berpusat pada  $x=21.242$ ,  $y=-3.094$ , dan  $z = 2.081$  untuk 3KQ0, dan 0.708 Å dengan berpusat pada  $x = 11.194$ ,  $y = 1.306$ , dan  $z = 29.976$  untuk 3APU. Tiada dok secara spesifik untuk kedua-dua varian AAG kerana hanya terdapat satu tapak pengikatan utama yang berpusat pada tengah protein untuk pengikatan pelbagai dadah.

Penilaian tenaga pengikatan MTG dan 7-OH-MTG telah dijalankan menggunakan algoritma genetik Lamarckian. Carian tempatan digunakan sebagai enjin carian dengan jumlah 1000 output untuk eksperimen dok secara rawak untuk kedua-dua protein dan kemudian 100 output untuk setiap tapak pengikatan spesifik (tapak I, II dan III) HSA. Penetapan saiz populasi adalah sebanyak 150 individu dengan 27 000 generasi. Sebanyak 250 000 penilaian tenaga telah digunakan dengan pengendali pemberat bagi pindah silang, mutasi dan elitisme ditetapkan pada 0.8, 0.02 dan 1.0. Untuk carian tempatan, parameter tetapan asal telah digunakan. Analisis kluster dilakukan pada output data dok menggunakan toleransi punca min sisihan kuasa dua (RMSD) antara struktur sebanyak 2.0 Å.

Untuk analisis pasca dok, konformasi terbaik dengan tenaga ikatan terkuat telah divisualisasikan dan dianalisis menggunakan AutoDockTools dan USCF Chimera versi 1.16 (Pettersen et al. 2004). Kemudian, daya intermolekul yang terlibat bagi pengkompleksan protein–ligan dianalisis menggunakan perisian Biovia Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

### 3.4.3 Analisis dinamik molekul

Simulasi dinamik molekul (MD) juga telah digunakan secara meluas untuk mengesahkan kestabilan kompleks yang dimodelkan secara *in silico* (Naqvi et al. 2018). Simulasi MD merupakan kaedah yang digunakan untuk mengkaji pergerakan atom dalam sistem biologi, serta memahami mekanisme interaksi antara molekul (Salo-Ahen et al. 2020). Data MD biasanya dianalisis untuk mendapatkan pemahaman tentang kestabilan pengkompleksan protein–ligan dan dapat melengkapkan hasil kajian eksperimen yang tidak dapat dikaji pada peringkat atom dengan mendalam.

Konformer terbaik dari setiap output simulasi digunakan untuk simulasi MD bagi meramalkan mod pengikatan dan kesan sebatian-sebatian psikoaktif ini terhadap konformasi protein. Simulasi MD telah dijalankan menggunakan perisian GROMACS versi 2022.3 (Abraham et al. 2015; van der Spoel et al. 2005). Parameter topologi bagi HSA dan kedua-dua varian AAG telah dihasilkan menggunakan medan daya GROMOS96 43a1 (Pol-Fachin, Fernandes & Verli 2009), yang juga telah diguna dalam beberapa simulasi sebelum ini bagi HSA dan AAG (Fernandes, Ligabue-Braun & Verli 2015; Ling et al. 2018). Fail parameter dan topologi bagi MTG dan 7-OH-MTG telah dibina menggunakan laman sesawang PRODRG Dundee (Schüttelkopf & van Aalten 2004).

Kemudian, setiap kompleks terendam (*immersed*) di dalam kotak kubik dengan molekul air jenis SPC-216 (van der Spoel, van Maaren & Berendsen 1998). Protein disusun di tengah pusat dan diposisikan sekurang-kurangnya 1.0 nm dari tepi, dan keadaan sempadan berkala (*periodic boundary conditions*) juga digunakan. Selepas menambah molekul air, sistem yang disolvat telah dineutralkan dengan menambah ion  $\text{Na}^+$  atau  $\text{Cl}^-$  dalam kotak simulasi untuk mengekalkan elektroneutraliti. Hasilnya, keseluruhan sistem terdiri daripada atom protein (HSA: 5843 atom; AAG varian F1\*S: 1872 atom; AAG varian A: 1913 atom), satu ligan (MTG atau 7-OH-MTG) dan ion  $\text{Na}^+$  (15 untuk HSA; 7 untuk AAG varian F1\*S; 5 untuk AAG varian A).

Untuk meminimumkan tenaga, kaedah penurunan tercuram (50 000 langkah) digunakan untuk pelepasan sentuhan tak serasi (*incompatible contact*) dengan pemotongan sejauh 1.2 nm untuk daya van der Waals dan Coulomb. Untuk mengelakkan penyisihan kedudukan protein semasa simulasi dinamik molekul, simulasi dilakukan menggunakan ensembel NVT (bilangan partikel, isipadu, suhu adalah malar) atau dikenali ensembel kanonik, dan ensembel NPT (bilangan partikel, tekanan, suhu adalah malar) atau dikenali ensembel isoterma-isobar. Algoritma lompatan katak (van Gunsteren & Berendsen 1988) digunakan untuk mengintegrasikan persamaan gerakan Newton kedua dengan langkah masa 2 fs. Kaedah *Particle Mesh Ewald* (PME) (Darden, York dan Pedersen 1993) digunakan dalam simulasi untuk menghitung interaksi elektrostatik jarak jauh dengan lebar grid 1.2 nm dan interpolasi kubik peringkat keempat. Ikatan HSA dan ligan diperhadkan semasa NVT dan NPT, dan algoritma kekangan holonomik *The LINear Constraint Solver* (LINCS) (Hess et al. 1997) digunakan untuk mengehadkan panjang ikatan yang melibatkan ikatan hidrogen.

Interaksi elektrostatik jarak pendek dan van der Waals diterangkan menggunakan skema pemotongan *Verlet* dengan 1.2 nm jejari pemotongan dan diperbaharui untuk setiap langkah masa. Semua suhu dikekalkan dengan gandingan suhu *V-rescale* semasa proses simulasi. Setiap sistem diseimbangkan selama 100 ps dengan NVT pada 300 K menggunakan termostat *V-rescale* (Berendsen terubah suai) (Bussi, Donadio & Parrinello 2007), diikuti dengan keseimbangan lain selama 100 ps dengan NPT pada 1 atm menggunakan barostat *Parrinello-Rahman* (Parrinello & Rahman 1981). Akhirnya, prosedur ini diikuti dengan simulasi MD sebanyak 100 ns dengan langkah masa 2 fs untuk semua sistem untuk menjana data trajektori.

Visualisasi trajektori dinamik molekul dilakukan menggunakan program VMD. Analisis dilakukan menggunakan pelbagai pakej program GROMACS termasuklah RMSD, fluktuasi punca min kuasa dua (RMSF), jumlah tenaga keseluruhan, jejari legaran ( $R_g$ ), dan luas permukaan yang boleh diakses pelarut (SASA).

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PERBINCANGAN**

#### **4.1 ANALISIS KESERUPAAN DADAH BAGI SEBATIAN MTG DAN 7-OH-MTG**

Ciri-ciri farmakokinetik yang tidak sesuai boleh menyumbang kepada kadar kejayaan rendah sebatian-sebatian bioaktif sebagai calon terapeutik. Oleh itu, analisis keserupaan dadah adalah langkah penting sebelum ujian makmal dan klinikal dilakukan untuk memberikan gambaran awal mengenai potensi dan kesan dadah terhadap tubuh manusia. Di dalam penyelidikan ini, penyaringan maya keserupaan dadah dan penelitian sifat-sifat farmakokinetik menggunakan perisian SwissADME, OSIRIS Property Explorer dan pkCSM telah dilakukan bagi kedua-dua sebatian alkaloid ketum, MTG dan 7-OH-MTG.

##### **4.1.1 Penilaian keserupaan dadah berdasarkan sifat fizikokimia**

Lima Peraturan Lipinski oleh Christopher Lipinski menggariskan bahawa beberapa sifat fisiokimia seperti berat molekul, kelipofilikan serta bilangan penerima dan penderma ikatan hidrogen sebagai kriteria yang sering digunakan untuk menentukan sesuatu sebatian sebagai calon dadah oral (Lipinski 2004). Seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 4.1, berat molekul bagi MTG (398.5 Da) dan 7-OH-MTG (414.5 Da) adalah tidak melebihi 500 Da, yang menunjukkan bahawa kedua-dua sebatian ini berkemungkinan dapat menembusi membrans sel dengan baik dan mudah mencapai tapak sasaran. Di samping itu, bilangan penerima dan penderma ikatan hidrogen bagi kedua-dua sebatian ini adalah optimum mengikut peraturan ini. Penerima dan penderma ikatan hidrogen ini penting untuk pengangkutan melalui membran, interaksi dadah-protein, pengedaran dan kelarutan dalam air (Bulusu & Desiraju 2020).

Jadual 4.1 Ciri-ciri fisikokimia dan keserupaan dadah bagi sebatian MTG dan 7-OH-MTG

Parameter fisiokimia	Nilai rujukan	MTG	7-OH-MTG
<sup>a</sup> Berat molekul, Da	<500	398.5	414.5
<sup>a,c</sup> Penderma ikatan hidrogen	≤5	1	1
<sup>a,c</sup> Penerima ikatan hidrogen	<10	4–5	6–7
<sup>a</sup> Log <i>P</i>	≤5	3.21	2.47
<sup>a</sup> Pembiasan molar, cm <sup>3</sup> /mol	40–130	116.89	115.35
<sup>c</sup> Keterlarutan dalam air (log mol/L)	Tinggi: >–2.0 Sederhana: –4.0 sehingga –2.0 Rendah: <–4.0	–4.181	–3.911
<sup>a</sup> Bilangan ikatan boleh berputar	<10	6	6
<sup>a</sup> Kebolehcapaian sintetik (SA)	0 ≤ SA ≤ 10	4.49	5.21
<sup>a</sup> Peraturan Lipinski	Ya/Tidak	Ya	Ya
<sup>a</sup> Peraturan Egan	Ya/Tidak	Ya	Ya
<sup>a</sup> Peraturan Ghose	Ya/Tidak	Ya	Ya
<sup>a</sup> Peraturan Muegge	Ya/Tidak	Ya	Ya
<sup>a</sup> Peraturan Veber	Ya/Tidak	Ya	Ya
<sup>a</sup> Skor bioketerdapatan	Tinggi: 0.85 Sederhana: 0.55 Rendah: 0.17	0.55	0.55
<sup>b</sup> Keserupaan dadah	Tinggi: Nilai positif Rendah: Nilai negatif	2.35	2.73
<sup>b</sup> Skor dadah	Kesesuaian dadah: 1 Ketidakesesuaian dadah: 0	0.73	0.78

a : Perisian SwissADME

b : Perisian OSIRIS Property Explorer

c : Perisian pkCSM

Seterusnya, parameter  $\log P$  adalah penting digunakan untuk menilai kemampuan penyerapan dan pengedaran sesuatu dadah dalam tubuh manusia. Sebatian berkutub, iaitu sebatian hidrofilik mempunyai nilai  $\log P$  kurang daripada 0 (Bhal et al. 2007). Sebaliknya, sebatian tidak berkutub, iaitu sebatian hidrofobik biasanya mempunyai nilai  $\log P$  melebihi 0 (Bhal et al. 2007). Sebatian yang sangat lipofilik ( $\log P > 5$ ) boleh meningkatkan risiko ketoksikan kerana mengikat kepada sasaran hidrofobik lain (Gao, Gesenberg & Zheng 2017) dan sangat pekat dalam lemak yang boleh menyebabkan masa penyingkiran yang lama (Barret 2018). Dalam kajian ini, nilai  $\log P$  bagi MTG dan 7-OH-MTG adalah  $< 5$  (Jadual 4.1), yang sesuai untuk penyerapan secara oral berdasarkan peraturan Lipinski (Lipinski 2004). Manakala, molar keterbiasan (kebolehkutuban) iaitu pengukuran kebolehkutuban sesuatu molekul (Bickerton et al. 2012), yang menunjukkan kedua-dua molekul berada pada tahap kebolehkutuban sederhana iaitu di antara 40 sehingga  $130 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Secara ringkasnya, kedua-dua sebatian ketum ini memenuhi kesemua kriteria peraturan ini, yang menjangkakan sifat farmakokinetik yang baik untuk penyerapan secara oral dan penyebaran dalam badan. Menariknya, kedua-dua sebatian tidak hanya mematuhi peraturan Lipinski, tetapi juga mematuhi beberapa peraturan keserupaan dadah yang lain, termasuklah peraturan Egan, Ghose, Muegge, dan Veber, dengan skor bioketerdapatan sebanyak 0.55 (Jadual 4.1).

Selain itu, sebanyak 6 ikatan boleh diputar yang diramalkan menggunakan perisian SwissADME bagi setiap sebatian ketum ini, yang boleh diandaikan bahawa kedua-dua molekul adalah optimum untuk penyerapan dan bioketerdapatan (Khaldan et al. 2022). Sebatian yang mempunyai bilangan ikatan boleh diputar yang tinggi (melebihi 10) boleh menyebabkan kadar penyerapan melalui membran berkurang dan keupayaan berinteraksi dengan reseptor sasaran menurun, yang seterusnya boleh mempengaruhi bioketerdapatan. Kebolehcapaian sintetik yang dianggarkan pula adalah 4.49 bagi MTG dan 5.21 bagi 7-OH-MTG (Jadual 4.1), menunjukkan bahawa MTG lebih mudah disintesis berbanding 7-OH-MTG. Meskipun, kedua-dua sebatian ini dijangkakan memerlukan proses sintetik tertentu, tetapi masih boleh dihasilkan menggunakan kaedah kimia yang sedia ada. Walau bagaimanapun, ini bukanlah isu utama bagi 7-OH-MTG kerana ia boleh dihasilkan melalui

pengubahsuaian kimia yang ringkas daripada MTG, yang merupakan alkaloid paling banyak dalam ketum.

Bioketerdapatn dadah yang diambil secara oral bergantung terutamanya kepada keterlarutannya dalam saluran gastrousus dan penelapannya melintasi membran sel (Mantri, Sanghvi & Zhu 2017). Keterlarutan dadah boleh dinilai berdasarkan nilai  $\log S$ , iaitu logaritma (asas 10) daripada keterlarutan yang diukur dalam unit mol/liter (kemolaran). Kelarutan sebatian bukan sahaja diramalkan melalui komposisi kimia, tetapi juga memerlukan data eksperimen dan simulasi pemodelan yang mendalam. Berdasarkan Jadual 4.1, keterlarutan dalam air bagi MTG ( $-4.181$  mol/L) adalah lebih rendah berbanding 7-OH-MTG ( $-3.911$  mol/L). Ini mungkin disebabkan oleh kehadiran kumpulan hidroksil dalam struktur 7-OH-MTG. Kedua-dua hasil ini menunjukkan kemungkinan terdapat isu dalam formulasi dan pengedaran disebabkan oleh keterlarutan yang rendah di dalam air. Namun, kekurangan ini mungkin tidak ketara kerana sebatian hidrofobik bergantung pada interaksinya dengan protein plasma untuk pengedaran dalam sistem peredaran (Tayyab & Feroz 2021).

Seterusnya, nilai keserupaan dadah yang diperoleh melalui perisian OSIRIS Property Explorer adalah jumlah nilai keserupaan dadah bagi fragmen substruktur yang terdapat dalam molekul yang disiasat. Nilai skor ini adalah berdasarkan 5300 pelbagai fragmen substruktur yang terhasil daripada 3300 dadah di pasaran dan 15 000 bahan kimia yang tersedia secara komersial. Nilai keserupaan dadah bagi MTG ialah 2.35 dan 7-OH-MTG ialah 2.73 (Jadual 4.1). Nilai positif ini menunjukkan kedua-duanya mengandungi fragmen-fragmen yang sering hadir dalam dadah sedia ada. Skor dadah pula merupakan hasil kombinasi data keserupaan dadah,  $cLogP$ ,  $\log S$ , berat molekul dan risiko ketoksikan, yang membentuk satu nilai berguna untuk menilai potensi keseluruhan sebatian tersebut sebagai dadah (Srivastava 2021). Nilai skor dadah bagi MTG dan 7-OH-MTG adalah 0.73 dan 0.78 (Jadual 4.1), mendekati kepada nilai skor 1 yang menunjukkan kesesuaian dadah yang cukup baik. Secara ringkasnya, ciri-ciri fisiokimia yang telah dihuraikan ini mencadangkan bahawa MTG dan 7-OH-MTG sebagai calon yang berpotensi untuk pembangunan dadah psikotropik.

#### 4.1.2 Jangkaan ciri-ciri farmakokinetik dan toksikologi

Maklumat terperinci mengenai ramalan ciri-ciri farmakokinetik bagi MTG dan 7-OH-MTG yang diperoleh adalah disenaraikan dalam Jadual 4.2. Berdasarkan ramalan ini, kedua-dua sebatian menunjukkan kadar penyerapan usus manusia yang tinggi, iaitu 92.97% bagi MTG dan 93.5% bagi 7-OH-MTG (Jadual 4.2). Ini bermakna kedua-dua sebatian ini mungkin diserap dengan baik dari saluran gastrousus ke dalam peredaran sistemik setelah pemberian secara oral. Sebatian MTG dan 7-OH-MTG juga dijangkakan bertindak sebagai substrat P-gp, dimana kepekatan kedua-duanya di dalam plasma mungkin berubah disebabkan oleh kehadiran perencat dan induser bagi pam efluks ini, yang seterusnya mempengaruhi keberkesanan dan kestabilan dadah (Chen et al. 2020).

Di samping itu, parameter taburan yang melibatkan kebolehtelapan BBB menunjukkan perbezaan dalam keupayaan MTG dan 7-OH-MTG untuk melintasi penghalang darah-otak, dengan kebolehtelapan BBB yang lebih tinggi bagi MTG (0.347) berbanding dengan 7-OH-MTG (-0.206) (Jadual 4.2). Perbezaan ini turut disokong oleh beberapa kajian terdahulu yang mendapati MTG mempunyai kadar penembusan ke otak dan keupayaannya yang tinggi untuk melalui halangan selular BBB berbanding 7-OH-MTG (Kruegel et al. 2019; Manda et al. 2014; Yusof et al. 2019). Sementara itu, nilai kebolehtelapan CNS bagi MTG adalah -2.27, manakala bagi 7-OH-MTG adalah -2.47, yang meramalkan bahawa kedua-dua sebatian mempunyai kebolehtelapan yang sederhana untuk mencapai kepekatan terapeutik di tisu otak melalui pemberian oral. Oleh itu, ramalan ini menjangkakan bahawa MTG berkemungkinan lebih banyak akses kepada tisu otak daripada 7-OH-MTG.

Seterusnya, enzim sitokrom P450 terlibat dalam metabolisme dadah dan bertanggungjawab untuk pengoksidaan dadah kepada bentuk mudah disingkirkan dari tubuh serta mengubahnya menjadi bentuk aktif atau tidak aktif. Dalam kajian ini, MTG dan 7-OH-MTG diramalkan bukan substrat CYP2D6, yang menunjukkan bahawa kedua-dua sebatian ini tidak dimetabolismekan oleh enzim tersebut. Walau bagaimanapun, kedua-dua sebatian ini didapati bertindak sebagai substrat untuk CYP3A4, iaitu enzim yang penting dalam biotransformasi xenobiotik (Zanger & Schwab 2013). Ini selari dengan kajian yang

Jadual 4.2 Ramalan ciri-ciri farmakokinetik dan ketoksikan sebatian MTG dan 7-OH-MTG

Ciri-ciri farmakokinetik	Nilai rujukan	Sebatian	
		MTG	7-OH-MTG
<b>Penyerapan</b>			
Penyerapan usus manusia (%)	Tinggi: >80% Sederhana: 30% sehingga 80% Rendah: <30%	92.967	93.503
Substrat P-gp	Ya/Tidak	Ya	Ya
<b>Taburan</b>			
Kebolehtelapan BBB (log BB)	Tinggi: >0.3 Sederhana: -1.0 sehingga 0.3 Rendah: <-1.0	0.347	-0.206
Kebolehtelapan CNS (log PS)	Tinggi: >-2.0 Sederhana: -3.0 sehingga -2.0 Rendah: <-3.0	-2.271	-2.470
<b>Metabolisme</b>			
Substrat CYP2D6	Ya/Tidak	Tidak	Tidak
Substrat CYP3A4	Ya/Tidak	Ya	Ya
Perencat CYP1A2	Ya/Tidak	Tidak	Tidak
Perencat CYP2C19	Ya/Tidak	Tidak	Tidak
Perencat CYP2C9	Ya/Tidak	Tidak	Tidak
Perencat CYP2D6	Ya/Tidak	Ya	Tidak
Perencat CYP3A4	Ya/Tidak	Ya	Tidak
<b>Perkumuhan</b>			
Jumlah keseluruhan klearans (log ml/min/kg)	Tinggi: >0.5 Sederhana: -0.5 sehingga 0.5 Rendah: <-0.5	0.859	0.781
Substrat OCT2 renal	Ya/Tidak	Ya	Ya
<b>Ketoksikan</b>			
Ketoksikan akut oral tikus (LD <sub>50</sub> ), (mol/kg)	Tinggi: >2.5 Sederhana: 1.5 sehingga 2.5 Rendah: <1.5	3.157	2.954
AMES ketoksikan	Ya/Tidak	Tidak	Tidak
Pemekaan kulit	Ya/Tidak	Tidak	Tidak
Risiko toksikologi	Tiada risiko: 1.0 Risiko sederhana: 0.8 Risiko tinggi: 0.6	1.0	1.0

dilaporkan oleh Kruegel et al. (2019) dan Kamble et al. (2019) mengenai peranan utama CYP3A4 dalam memungkinkan metabolisme MTG kepada 7-OH-MTG dalam manusia. Tambahan pula, MTG dan 7-OH-MTG tidak mempengaruhi enzim CYP1A2, CYP2C19, dan CYP2C9. Sebatian MTG yang diramalkan sebagai perencat CYP2D6 dan CYP3A4 adalah konsisten dengan laporan dalam beberapa kajian lepas (Kamble et al. 2020a; Tanna et al. 2021; Todd et al. 2020). Namun, 7-OH-MTG dijangkakan tidak memberikan kesan perencatan terhadap enzim-enzim ini. Dapatan yang diperoleh ini menyimpulkan bahawa enzim-enzim CYP terlibat dalam metabolisme MTG dan 7-OH-MTG, terutamanya enzim CYP3A4. Selanjutnya, kedua-dua sebatian berkemungkinan memperlihatkan tahap eliminasi yang tinggi, dengan indeks keseluruhan klearans yang ketara iaitu 0.859 untuk MTG dan 0.781 untuk 7-OH-MTG. Selain itu, kedua-dua sebatian ini mungkin juga merupakan substrat untuk pengangkut kation organik 2 (OCT2) renal, yang memberi gambaran bahawa sebahagian besar penyingkiran berlaku melalui proses perkumuhan ginjal.

Sifat toksikologi diramalkan berdasarkan perisian pkCSM mendapati bahawa MTG dan 7-OH-MTG tidak memberi kesan dalam ujian ketoksikan AMES yang berkaitan mutasi genetik dan ujian pemekaan kulit. Nilai LD<sub>50</sub> MTG ialah 3.157, adalah lebih tinggi berbanding 2.954 bagi 7-OH-MTG, menunjukkan MTG mempunyai ketoksikan yang rendah berbanding 7-OH-MTG. Namun, kedua-dua sebatian ini mempunyai nilai LD<sub>50</sub> yang tinggi, kemungkinan menunjukkan ketoksikan akut yang minimum. Risiko ketoksikan (mutagen, tumorigen, iritasi dan kesan kepada sistem produktif) juga telah diramalkan menggunakan perisian OSIRIS Property Explorer, yang menunjukkan kedua-dua sebatian berkemungkinan menunjukkan tingkah laku yang sepadan dengan dadah tanpa risiko kesan sampingan yang tidak diinginkan. Terdapat juga sebatian psikoaktif lain yang dianggap selamat berdasarkan penilaian ini termasuklah cenobamate, lasmiditan, mirogabelin, remimazolam dan solriamfetol (Srivastava 2021). Oleh itu, penggunaan MTG dan 7-OH-MTG adalah kemungkinan selamat dari segi ketoksikan akut dan kesan sampingan yang lain. Namun, ramalan ini tidak boleh dianggap sepenuhnya tepat dan tidak menjamin keselamatan atau bebas dari kesan toksik lainnya.

Kesimpulannya, MTG dan 7-OH-MTG dijangkakan menunjukkan ciri-ciri farmakokinetik yang baik, risiko ketoksikan rendah dan keserupaan dadah yang baik. Walau bagaimanapun, penilaian-penilaian yang dijalankan diatas ini hanyalah sebahagian aspek dalam penilaian keseluruhan terhadap sebatian. Oleh itu, analisis holistik yang merangkumi kajian interaksi sebatian MTG dan 7-OH-MTG dengan protein plasma adalah diperlukan untuk memahami dengan komprehensif tentang sifat dan potensi farmakologi sebatian ketum atau sebatian derivatifnya.

#### **4.2 PARAMETER PENGIKATAN DAN TERMODINAMIK BAGI INTERAKSI MTG DENGAN PROTEIN PLASMA**

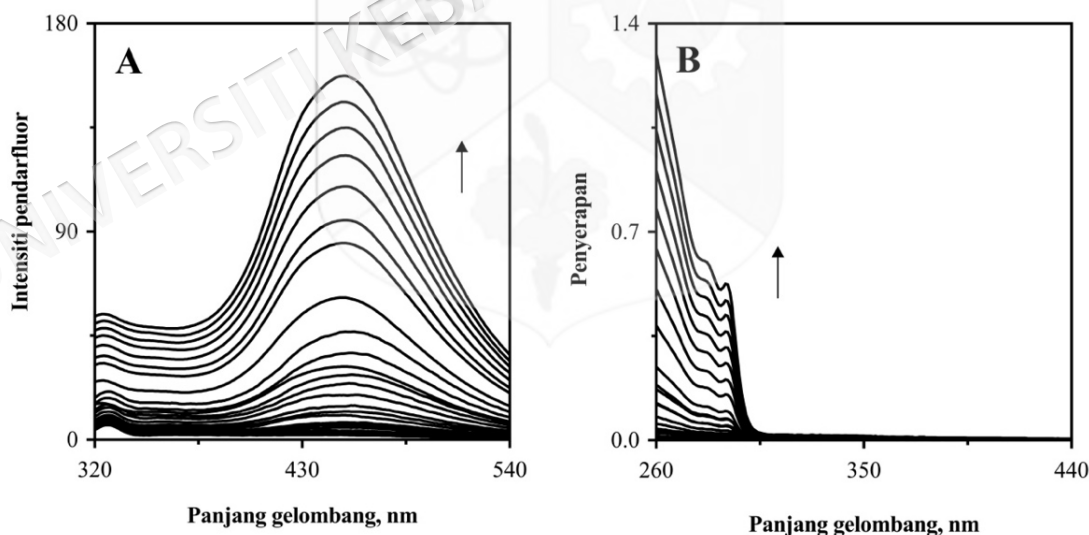
Kajian interaksi antara MTG dengan HSA dan AAG telah dijalankan menggunakan dua pendekatan biofizik iaitu spektroskopi pendarfluor dan ITC. Kaedah spektroskopi pendarfluor telah dijalankan untuk menyiasat perubahan pendarfluor protein plasma dengan kehadiran sebatian psikotropik ketum yang menunjukkan pengikatan protein–ligan. Manakala, pengukuran haba (dibebaskan atau diserap) semasa suatu mekanisme interaksi protein–ligan berlaku melalui eksperimen ITC turut dilakukan dalam kajian ini. Kedua-dua kaedah ini memberikan data kuantitatif iaitu pemalar asosiasi ( $K_a$ ), yang berkaitan dengan kekuatan pengikatan antara protein dan ligan. Kaedah ITC juga memberikan maklumat mengenai parameter pengikatan dan termodinamik termasuklah perubahan entalpi ( $\Delta H$ ), entropi ( $\Delta S$ ), tenaga bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) dan stoikiometri ( $n$ ).

##### **4.2.1 Analisis pentitratan pendarfluor bagi sistem MTG–HSA dan MTG–AAG**

Pendarfluor intrinsik sesuatu protein disumbangkan oleh asid amino fluorofor iaitu triptofan (Trp), tirosin (Tyr) dan fenilalanin (Phe). Residu Trp mempunyai penyerapan molar dan kuantum keamatan pendarfluor yang tinggi kerana memiliki gegelang indol (Lakowicz 2006; Shimazaki, Yajima & Yamauchi 2015). Fluorofor lain iaitu Tyr dan Phe juga terlibat, namun menghasilkan isyarat yang lemah (Zacharioudaki, Fitis & Kotti 2022). Pendarfluor Tyr hampir dilindapkan sepenuhnya apabila ia terion atau berada berhampiran kumpulan amina, kumpulan karboksilat, asid karboksilik atau residu Trp, manakala pendarfluor Phe kurang ketara kerana ia mempunyai hasil kuantum yang sangat

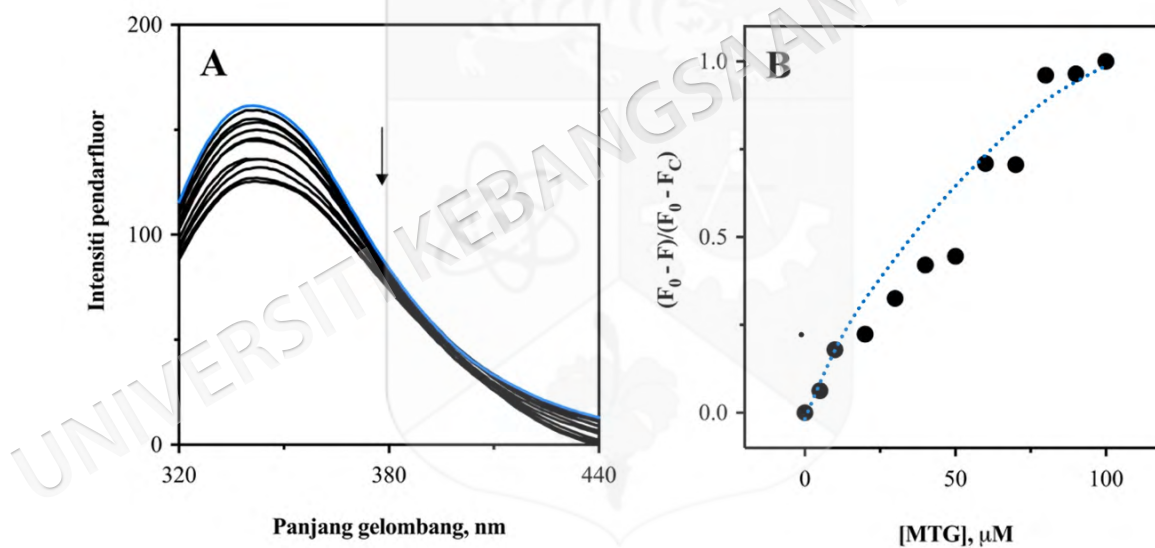
rendah (Lakowicz 2006). Maka, perubahan spektrum pendarfluor HSA dan AAG tanpa dan dengan kehadiran MTG dianalisis menggunakan panjang gelombang pengujaan 295 nm, yang dipilih secara selektif untuk residu Trp, dengan pengukuran spektrum pancaran pada 320–440 nm.

Sebelum analisis lanjutan dilakukan, isyarat pendarfluor protein setelah penambahan MTG telah ditolak dengan isyarat yang terhasil daripada MTG bebas. Seperti yang digambarkan pada Rajah 4.1A, MTG bebas mempunyai isyarat pendarfluor yang lemah pada panjang gelombang pancaran (320–540 nm), dengan puncak maksimum pada 452 nm. Seterusnya, pembetulan kesan turasan dalaman menggunakan persamaan 3.3 juga dilakukan bagi penyerapan pada panjang gelombang pengujaan dan pancaran sampel yang disebabkan penambahan ligan (Fonin et al. 2014). Spektrum serapan bagi MTG bebas (0–100  $\mu\text{M}$ ) juga telah direkodkan pada panjang gelombang 260 sehingga 440 nm (Rajah 4.1B) dan bentuk spektrum serapan yang diperolehi ini adalah sama seperti yang telah dilaporkan dalam beberapa kajian lepas (Parthasarathy et al. 2013; Saref et al. 2019).



Rajah 4.1 (A) Spektrum pendarfluor dan (B) penyerapan UV-Vis bagi MTG bebas.  $[\text{MTG}] = 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90$  dan  $100 \mu\text{M}$  (dari bawah ke atas),  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ .

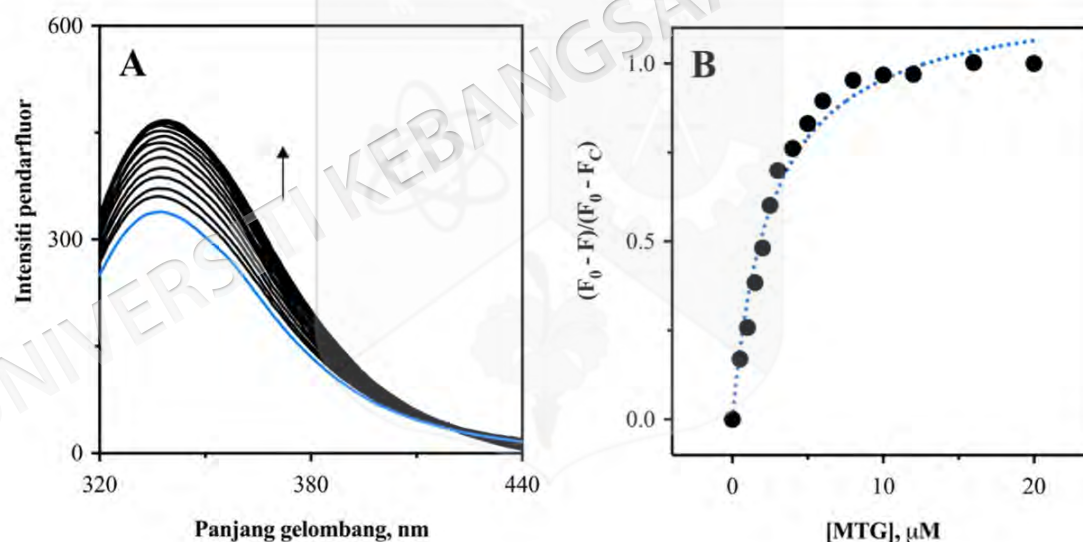
Spektrum pendarfluor HSA seperti yang digambarkan dalam Rajah 4.2A menunjukkan pemelindapan pendarfluor dengan kehadiran MTG (5–100  $\mu\text{M}$ ). Pancaran maksimum yang diperoleh bagi protein HSA adalah pada 341 nm, yang disumbangkan oleh residu Trp tunggal iaitu Trp-214 yang terletak di subdomain IIA HSA (Kandandapani et al. 2022). Proses pemelindapan pendarfluor atau penurunan intensiti pendarfluor sesuatu protein ini boleh berlaku melalui pelbagai interaksi molekul, termasuklah penyusunan semula molekul, pembentukan kompleks keadaan asas (*ground state*), tindak balas keadaan teruja (*excited state*), pemindahan tenaga dan pemelindapan perlanggaran (Lakowicz 2006; Yammine, Gao & Kwan 2019). Penurunan intensiti pendarfluor sering diperhatikan dalam interaksi HSA dengan pelbagai dadah, seperti yang dilaporkan untuk dadah psikotropik olanzapine (Mrkalić et al. 2021) dan sertraline (Shahlaei et al. 2015).



Rajah 4.2 (A) Pemelindapan pendarfluor HSA dengan kehadiran MTG berkepekatan semakin meningkat. (B) Plot  $(F_0 - F)/(F_0 - F_C)$  melawan  $[\text{MTG}]$  bagi interaksi MTG–HSA. Garisan berwarna biru mewakili spektrum HSA bebas.  $[\text{HSA}] = 3 \mu\text{M}$ ,  $[\text{MTG}] = 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90$  dan  $100 \mu\text{M}$  (dari atas ke bawah),  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ .

Sebaliknya, isyarat pendarfluor AAG menunjukkan peningkatan setelah pentitratan MTG (0.5–20  $\mu\text{M}$ ), dengan pancaran maksimum pada 337 nm (Rajah 4.3A). Puncak

spektrum pancaran AAG ini disumbangkan oleh fluorofor intrinsik dominan iaitu residu Trp-25, yang terbenam dalam saku hidrofobik protein ini. AAG juga mempunyai residu Trp yang lain, namun tidak menghasilkan isyarat pendarfluor yang ketara, iaitu Trp-160 yang terletak pada kawasan terdedah kepada pelarut dan Trp-122 yang berada di antara permukaan molekul dan saku pengikatan (AlAjmi et al. 2020). Isyarat pendarfluor yang terhasil menjadi lebih kuat setelah penambahan ligan yang mencadangkan kebarangkalian residu Trp-25 semakin terlindung dari pemelindapan pelarut dan kurang terdedah kepada pelarut (D'Agostino et al. 2019). Beberapa kajian lepas juga menunjukkan peningkatan intensiti pendarfluor bagi pengkompleksan protein–ligan tertentu (Chakraborty et al. 2019; D'Agostino et al. 2019; Ghobadi et al. 2018). Perubahan dalam trend pancaran dengan kehadiran ligan, sama ada berkurang atau bertambah, berperanan sebagai indikator berlakunya interaksi antara protein dan ligan (D'Agostino et al. 2019).



Rajah 4.3 (A) Peningkatan pendarfluor AAG dengan kehadiran MTG berkepekatan semakin meningkat. (B) Plot  $(F_0 - F)/(F_0 - F_C)$  melawan  $[MTG]$  bagi interaksi MTG–AAG. Garisan berwarna biru mewakili spektrum AAG bebas.  $[AAG] = 3 \mu M$ ,  $[MTG] = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 16$  dan  $20 \mu M$  (dari bawah ke atas),  $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$ .

Di dalam kajian ini, perubahan intensiti pendarfluor apabila MTG ditambahkan ke dalam larutan protein menjelaskan potensi interaksi di antara kedua-dua protein plasma

dengan molekul pelindap, MTG. Perubahan intensiti pendarfluor kedua-dua protein plasma adalah berkadar terus dengan kepekatan MTG, dengan AAG menunjukkan perubahan yang lebih ketara berbanding HSA. Perbandingan isyarat pendarfluor menunjukkan HSA memerlukan nisbah kepekatan [MTG]:[protein] sebanyak 33:1 untuk mencapai ketepuan, berbanding hanya 6:1 bagi AAG. Pada nisbah molar MTG/protein ~6, peratusan perubahan intensiti pendarfluor adalah kira-kira 5% bagi HSA dan 45% bagi AAG. Selain itu, panjang gelombang pancaran maksimum HSA kekal konsisten tanpa sebarang anjakan, manakala AAG menunjukkan anjakan yang kecil (337→339 nm) setelah pentitratan MTG. Fenomena ini dikenali sebagai anjakan merah atau anjakan batokrom yang menjelaskan peralihan spektrum ke arah panjang gelombang yang lebih tinggi dengan penurunan tenaga (Abdelhameed et al. 2019). Oleh itu, penemuan ini mencadangkan kesan yang minimum terhadap mikropersekitaran fluorofor (residu Trp) yang mencerminkan perubahan konformasi AAG (AlAjmi et al. 2020).

Seterusnya, data-data ini dianalisis menggunakan persamaan 3.2, yang amnya digunakan bagi menganalisis perubahan pendarfluor untuk menentukan nilai  $K_a$  (Rajah 4.2B dan Rajah 4.3B). Penentuan nilai  $K_a$  bagi kompleks MTG-HSA dan MTG-AAG, diandaikan dengan pembentukan kompleks tepu 1:1. Nilai  $K_a$  yang telah diperoleh adalah  $(2.34 \pm 0.46) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  bagi kompleks MTG-HSA dan  $(3.78 \pm 0.11) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  untuk kompleks MTG-AAG. Ini menunjukkan afiniti pengikatan yang lebih tinggi bagi molekul MTG kepada AAG berbanding dengan HSA. Walaupun nilai ini lebih rendah berbanding dengan  $K_a$  untuk pengikatan kebanyakan dadah kepada HSA, namun kajian terdahulu telah melaporkan bahawa sebatian MTG dan alkaloid ketum yang lain mempamerkan pengikatan protein plasma yang tinggi (>90%) (Manda et al. 2014; Obeng et al. 2020; Yusof et al. 2019). Interaksi MTG dengan protein plasma dijangkakan boleh membawa kepada peningkatan keterlarutan, pengurangan ketoksikan, perlindungan dari pengoksidaan dan pemanjangan separuh hayat *in vivo* sebatian psikoaktif ini (Kragh-Hansen, Chuang & Otagiri 2002).

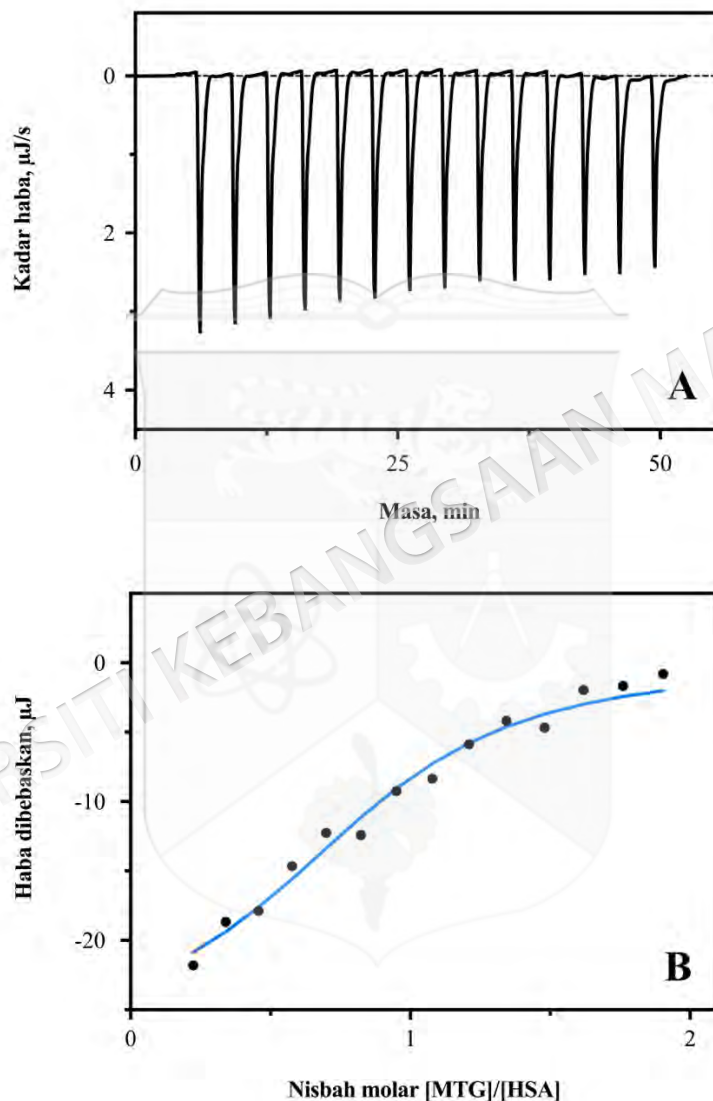
#### 4.2.2 Analisis data ITC bagi kompleks MTG–HSA dan MTG–AAG

Penggunaan kaedah lain seperti ITC adalah bertujuan untuk mengesahkan keaifan pengikatan yang ditentukan daripada analisis pentitratan pendarfluor dan untuk memperoleh beberapa data termodinamik bagi pemahaman menyeluruh mengenai interaksi protein–ligan. Antara parameter pengikatan dan termodinamik dikenalpasti daripada kaedah ITC adalah nilai  $K_a$ ,  $n$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  dan  $\Delta G$  (Srivastava & Yadav 2019). Kaedah ini membolehkan pengesanan tanpa label menerusi pengukuran haba secara langsung disebabkan oleh mekanisme pengikatan protein–ligan (Prozeller, Morsbach & Landfester 2019).

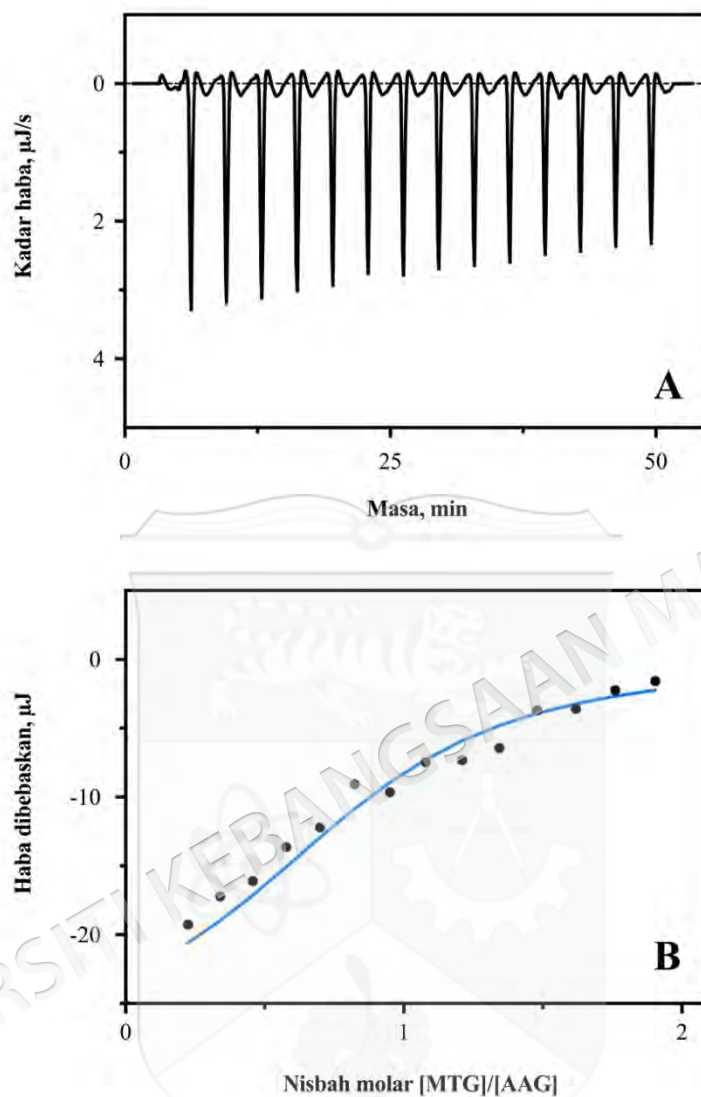
Rajah 4.4A dan Rajah 4.5A memaparkan termogram ITC pada 25 °C yang menggambarkan respons kalorimetri semasa penyuntikan MTG kepada kedua-dua protein plasma, HSA dan AAG. Puncak negatif pada graf menunjukkan sifat eksoterma bagi kedua-dua interaksi MTG–HSA dan MTG–AAG. Setiap puncak termogram pengikatan dihasilkan melalui satu penyuntikan larutan MTG ke dalam larutan protein, yang mencerminkan perubahan haba yang berlaku semasa proses pengikatan ini. Rajah 4.4B dan Rajah 4.5B menunjukkan integrasi kadar haba kepada haba keseluruhan yang dibebaskan bagi setiap mol titran melawan nisbah molar MTG/protein. Data ini kemudiannya dianalisis berdasarkan model pengikatan tak bersandar menggunakan perisian NanoAnalyze bagi memadamkan dan menganalisis data asal untuk memperoleh nilai parameter pengikatan dan termodinamik seperti yang disenaraikan di dalam Jadual 4.3.

Nilai  $K_a$  yang diukur daripada teknik ITC menunjukkan bahawa sistem MTG–AAG mempunyai afiniti yang lebih tinggi dengan nilai  $(2.19 \pm 1.08) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , berbanding  $(5.87 \pm 7.14) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  bagi sistem MTG–HSA. Perbezaan yang ketara ini memperlihatkan interaksi yang lebih utama antara MTG dan AAG. Bagi kompleks MTG–HSA, nilai  $K_a$  yang diperoleh daripada eksperimen ITC adalah satu magnitud yang lebih besar daripada nilai hasil pengukuran pendarfluor, namun nilai  $K_a$  bagi MTG–AAG adalah sama magnitud bagi kedua-dua eksperimen. Memandangkan ITC merupakan kaedah yang lebih langsung untuk menentukan afiniti pengikatan, maka nilai  $K_a$  yang diperoleh daripada analisis ITC

harus dianggap lebih tepat. Oleh itu, adalah disarankan agar parameter pengikatan yang ditentukan secara tidak langsung diberi perhatian dengan berhati-hati, terutamanya jika tiada kaedah lain untuk pengesahan.



Rajah 4.4 Profil kalorimetri pentitratan isoterma bagi interaksi di antara HSA dengan MTG. (A) Tindak balas kalorimetri terhadap penyuntikan berturutan MTG ( $300 \mu\text{M}$ ) ke dalam larutan HSA ( $50 \mu\text{M}$ ). (B) Plot integrasi jumlah haba yang dibebaskan bagi setiap suntikan melawan nisbah molar MTG/protein. Garisan biru menggambarkan nilai haba yang diukur berdasarkan model pengikatan tak bersandar.



Rajah 4.5 Profil kalorimetri pentitratan isoterma bagi interaksi di antara AAG dengan MTG. (A) Tindak balas kalorimetri terhadap penyuntikan berturutan MTG ( $300 \mu\text{M}$ ) ke dalam larutan AAG ( $40 \mu\text{M}$ ). (B) Plot integrasi jumlah haba yang dibebaskan bagi setiap suntikan melawan nisbah molar MTG/protein. Garisan biru menggambarkan nilai haba yang diukur berdasarkan model pengikatan tak bersandar.

Magnitud nilai  $K_a$  yang diukur menggunakan teknik spektroskopi pendarfluor dan eksperimen ITC berada dalam julat  $10^3$ – $10^6 \text{ M}^{-1}$ , menunjukkan afiniti pengikatan sederhana MTG terhadap kedua-dua protein (HSA dan AAG). Tambahan lagi, sebatian

MTG dan 7-OH-MTG mempunyai struktur indol iaitu sebatian organik heterosiklik aromatik yang mengandungi gelang benzena dan pirola. Menariknya, kajian terdahulu mengenai beberapa sebatian terbitan indol didapati juga mengikat pada protein plasma dengan afiniti pengikatan sederhana (Pawar, Kalalbandi & Jaldappagari 2018; Uzelac et al. 2019; Wani et al. 2019). Ini menunjukkan bahawa struktur indol yang unik ini memberikan ciri-ciri istimewa dalam interaksi sebatian psikotropik ini (MTG dan 7-OH-MTG) dengan protein plasma. Afiniti pengikatan bagi beberapa jenis dadah dan sebatian terapeutik lain terhadap HSA dan AAG, menunjukkan bahawa afiniti pengikatan pada julat sederhana adalah ciri-ciri umum bagi sebatian yang baik dalam kajian farmakokinetik (AlAjmi et al. 2020; Jiang et al. 2023; Kandandapani et al. 2022). Nilai  $K_a$  yang diperoleh dalam kajian ini menyokong pengangkutan yang efisien bagi MTG dalam saluran darah dengan memudahkan asosiasi dan pelepasan di lokasi sasaran. Seterusnya, nilai  $n$ , iaitu berkaitan tentang jumlah molekul ligan yang mengikat pada satu molekul protein pada fasa ketepuan (Freyer & Lewis 2008). Nilai  $n$  untuk MTG–AAG ( $1.15 \pm 0.32$ ) lebih tinggi berbanding dengan MTG–HSA ( $0.96 \pm 0.13$ ), mungkin melibatkan pengikatan satu molekul MTG kepada satu molekul protein. Kedua-dua nilai  $n$  ini menghampiri satu ini adalah selari dengan andaian yang menggunakan persamaan dalam menentukan nilai  $K_a$ , yang menjangkakan pengikatan ini berlaku dalam nisbah 1:1 (protein:ligan).

Selain itu, perubahan haba dalam tindak balas dijelaskan oleh  $\Delta H$ ; tindak balas eksotermik (pembebasan haba) menghasilkan nilai  $\Delta H$  negatif, manakala tindak balas endotermik (penyerapan haba) pula mempunyai  $\Delta H$  positif (DebolinaMitra 2020). Hasil kajian mendapati kedua-dua kompleks menunjukkan tindak balas eksotermik (Jadual 4.3), kompleks MTG–AAG memiliki nilai  $\Delta H$  yang lebih negatif ( $-92.62 \pm 0.73 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) dibandingkan dengan kompleks MTG–HSA ( $-24.10 \pm 3.43 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), menunjukkan bahawa pengikatan antara AAG kepada MTG lebih kuat dan menghasilkan lebih banyak haba. Ini biasanya terkait dengan pembentukan ikatan hidrogen yang kuat atau interaksi van der Waals yang spesifik. Secara amnya, pembentukan daya van der Waals, interaksi elektrostatik, atau ikatan hidrogen adalah proses eksotermik ( $\Delta H < 0$ ) yang dominan bagi permukaan hidrofilik. Sebaliknya, penyahsolvatan iaitu pelepasan air terhidrasi adalah

proses adalah proses endotermik ( $\Delta H > 0$ ) yang dominan bagi permukaan hidrofobik yang mempamerkan penglibatan interaksi hidrofobik (DebolinaMitra 2020; Prozeller, Morsbach & Landfester 2019).

Jadual 4.3 Parameter pengikatan dan termodinamik bagi interaksi antara MTG dengan HSA dan AAG yang diperoleh daripada pengukuran ITC pada pH 7.4 dan 25 °C

Parameter	Sistem	
	Kompleks MTG–HSA	Kompleks MTG–AAG
$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$(5.87 \pm 7.14) \times 10^4$	$(2.19 \pm 1.08) \times 10^5$
$n$	$0.96 \pm 0.13$	$1.15 \pm 0.32$
$\Delta H$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	$-24.10 \pm 3.43$	$-92.62 \pm 0.73$
$\Delta S$ ( $J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ )	$8.23 \pm 2.61$	$-231.35 \pm 0.02$
$\Delta G$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	$-26.10 \pm 3.38$	$-30.24 \pm 0.38$

Dapatan kajian ini menunjukkan perbezaan nilai  $\Delta S$  (Jadual 4.3),  $\Delta S$  positif bagi kompleks MTG–HSA ( $8.23 \pm 2.61\ J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ ) dan  $\Delta S$  negatif bagi kompleks MTG–AAG ( $-231.35 \pm 0.02\ J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ ). Hasil ini menunjukkan bahawa pengikatan MTG pada AAG menghasilkan sesebuah sistem yang lebih teratur berbanding pada HSA. Pengikatan ligan kepada protein yang menyebabkan penurunan entropi ( $\Delta S$  negatif) biasanya dikaitkan dengan pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals. Proses ini menghadkan pergerakan konformasi atau menggalakkan pembentukan struktur yang lebih teratur. Manakala, peningkatan entropi ( $\Delta S$  positif) menjelaskan penyahsolvatan kerana air yang dilepaskan menjadi lebih berserak dan kurang teratur dan fenomena ini dikaitkan dengan interaksi hidrofobik (Prozeller, Morsbach & Landfester 2019; Ross & Subramanian 1981). Selain itu, nilai  $\Delta G$  lebih negatif untuk kompleks MTG–AAG ( $-30.24 \pm 0.38\ kJ\ mol^{-1}$ ) dibandingkan dengan kompleks MTG–HSA ( $-26.10 \pm 3.38\ kJ\ mol^{-1}$ ) menunjukkan

tidakbalas pengikatan bagi kompleks MTG–AAG lebih spontan secara termodinamik. Data termodinamik  $\Delta G$  adalah keupayaan sesuatu tindak balas atau proses untuk berlaku secara spontan;  $\Delta G$  negatif menunjukkan tindak balas spontan,  $\Delta G$  positif menunjukkan tindak balas tidak spontan dan  $\Delta G$  sifar menunjukkan sistem dalam keadaan ekulibrium (Prozeller, Morsbach & Landfester 2019). Hasil yang diperoleh menjelaskan kekuatan interaksi antara AAG dan MTG, seperti ikatan hidrogen atau van der Waals yang lebih kuat.

Konklusinya, nilai  $K_a$  menunjukkan keafinan pengikatan sederhana bagi kedua-dua kompleks, kompleks MTG–AAG mempunyai afiniti yang lebih tinggi berbanding dengan kompleks MTG–HSA. Ini menjelaskan penghantaran dan pengangkutan yang baik, yang boleh membantu penelapan sebatian indol ini daripada sistem peredaran menuju sasaran terapeutiknya. Perubahan entalpi negatif menunjukkan sifat tindak balas eksotermik dan nilai  $\Delta G$  negatif bagi tindak balas secara spontan, menjelaskan pengikatan MTG pada AAG lebih kuat dengan pembebasan haba yang tinggi. Pengikatan MTG pada protein mengakibatkan perubahan entropi,  $\Delta S$  negatif untuk kompleks MTG–AAG, sementara  $\Delta S$  positif untuk kompleks MTG–HSA. Maklumat yang diperoleh ini dapat membantu para penyelidik mengoptimumkan dadah dengan memastikan dadah mempunyai masa peredaran yang cukup untuk mencapai kesan terapeutik.

#### **4.3 KESAN INTERAKSI MTG TERHADAP KONFORMASI HSA DAN AAG**

Memahami perubahan konformasi protein adalah penting untuk menghuraikan mekanisme interaksi sesuatu molekul, meramalkan tindak balas biokimia dan mencipta intervensi yang terarah kepada pelbagai bidang seperti bioteknologi, perubatan dan farmaseutikal. Disebabkan MTG telah diketahui berinteraksi dengan HSA dan AAG, maka perubahan struktur protein setelah pengikatan MTG telah disiasat menggunakan penyerapan UV, spektroskopi pendarfluor 3D, AFM dan spektroskopi CD. Kesemua teknik biofizik ini menyediakan gambaran yang holistik tentang bagaimana pengikatan MTG mempengaruhi struktur dan fungsi HSA dan AAG, yang penting untuk mengetahui mekanisme tindakan MTG dan implikasi terapeutiknya.

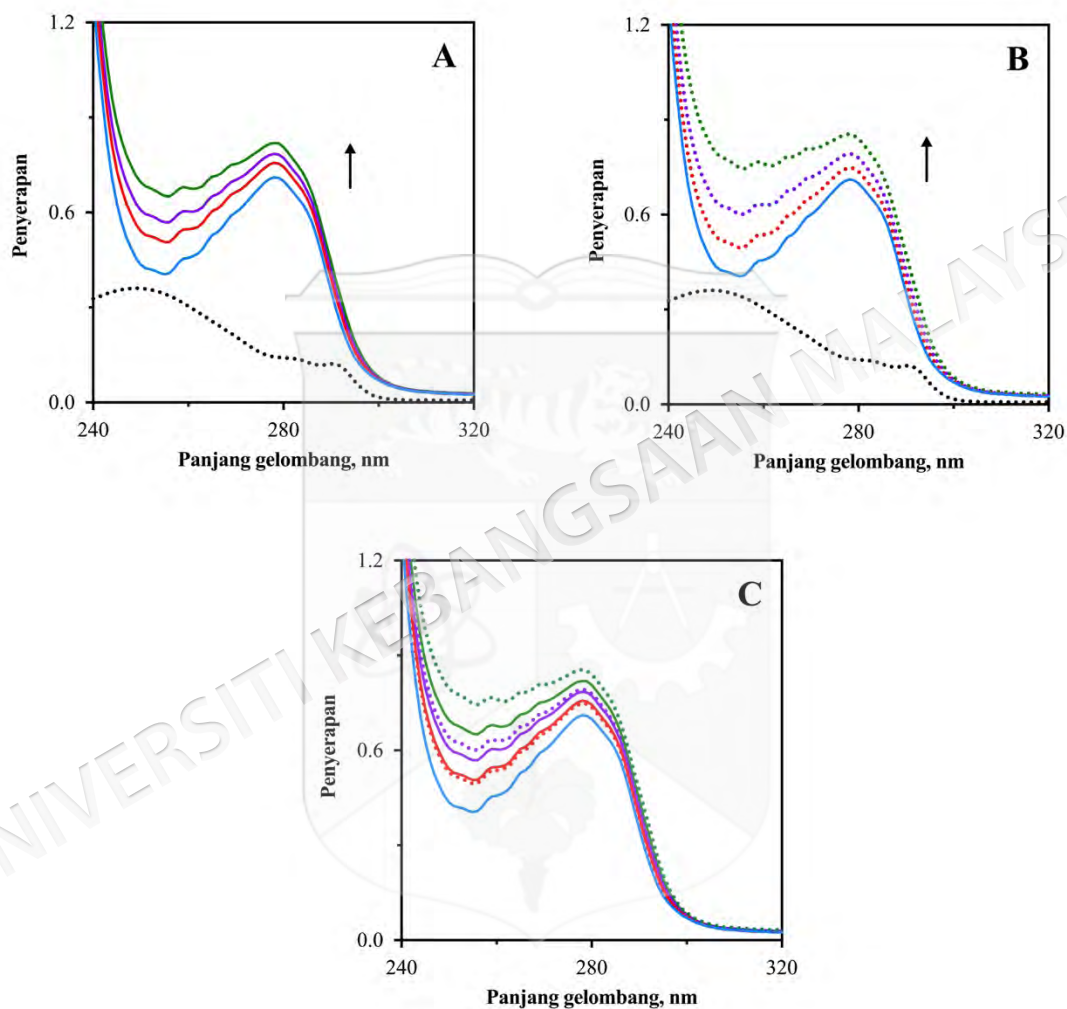
#### 4.3.1 Ciri-ciri spektrum penyerapan UV protein setelah pengikatan MTG

Pengukuran serapan UV adalah teknik yang agak mudah dan merupakan pendekatan yang biasa diaplikasikan untuk mengkaji mekanisme interaksi protein–ligan. Teknik ini juga membenarkan perubahan struktur protein dikenalpasti dengan meneliti sifat optik melalui penyerapan cahaya pada panjang gelombang tertentu akibat perubahan susunan elektron dan geometri molekul. Di dalam kajian ini, analisis spektrum penyerapan UV HSA dan AAG tanpa dan dengan MTG pada kepekatan yang berbeza (6, 12 dan 20  $\mu\text{M}$ ) telah dijalankan. Analisis ini dilakukan untuk mengesahkan dapatan kajian pentitratan pendarfluor dan eksperimen ITC berkaitan pengkompleksan protein–ligan dan perubahan konformasi protein.

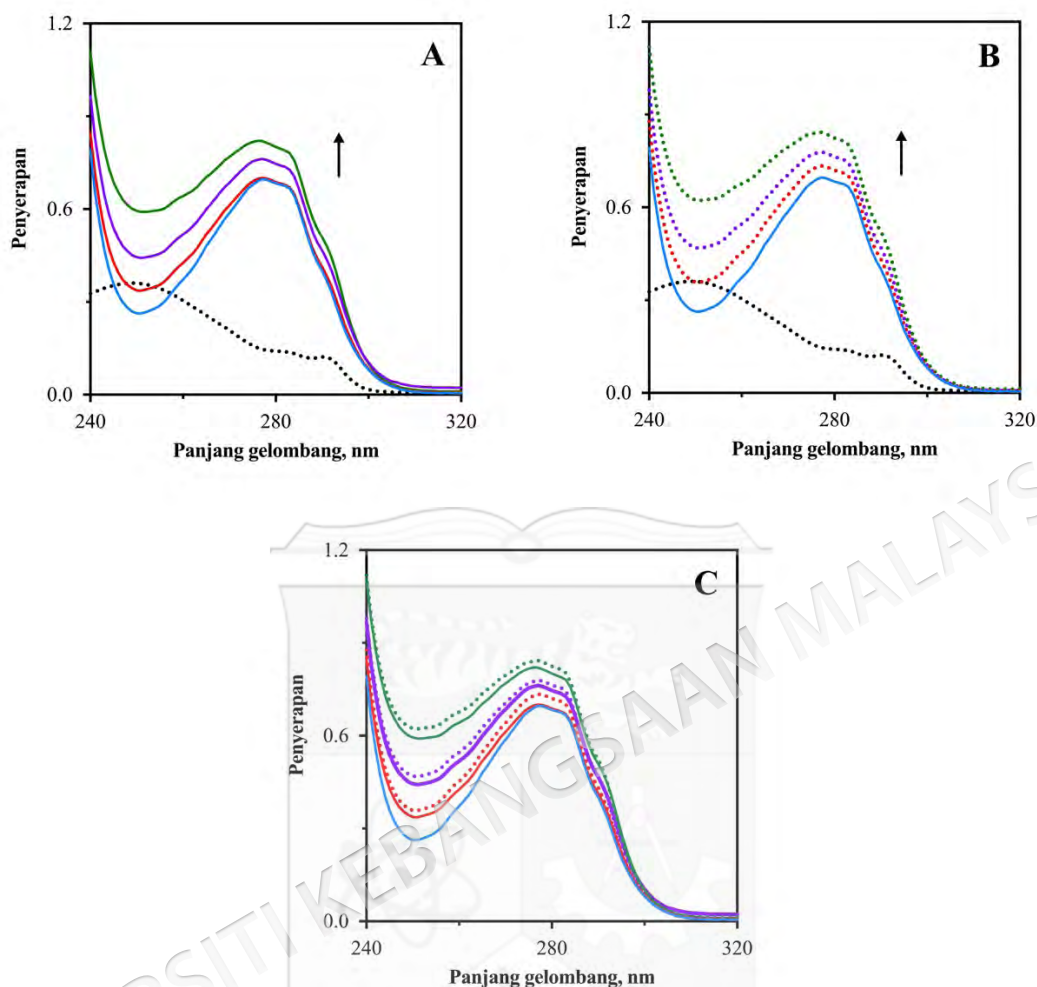
Rajah 4.6A dan Rajah 4.7A menunjukkan spektrum serapan HSA dan AAG (garisan biru), tanpa dan dengan penambahan MTG (6, 12, 20  $\mu\text{M}$ ) pada julat panjang gelombang 240–320 nm. MTG bebas (garisan titik-titik hitam) menunjukkan penyerapan yang kuat pada 253 nm dan mempunyai puncak kecil pada 295 nm. Corak spektrum serapan UV HSA dan AAG dengan maksimum pada 278 nm adalah disebabkan oleh transisi  $\pi\text{--}\pi^*$  melibatkan gelang fenil residu asid amino aromatik (Jiang et al. 2023). Kehadiran MTG berkepekatan semakin meningkat telah menghasilkan peningkatan dalam spektrum penyerapan atau anjakan hiperkrom bagi HSA (Rajah 4.6A) dan AAG (Rajah 4.7A), yang mencadangkan perubahan mikro-persekitaran di sekitar kromofor protein yang disebabkan oleh pembentukan kompleks protein–MTG. Walaubagaimanapun, pemerhatian ini mungkin juga disebabkan oleh penyerapan MTG bebas dan bukannya oleh interaksi spesifik antara HSA dan AAG dengan MTG.

Oleh itu, spektrum hasil jumlah penyerapan protein bebas dan MTG bebas telah digunakan sebagai perbandingan, seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.6B dan Rajah 4.7B. Bagi HSA, spektrum yang terhasil mempamerkan isyarat penyerapan yang lebih kuat berbanding dengan spektrum penyerapan larutan campuran MTG–HSA (Rajah 4.6A), terutamanya pada kepekatan MTG yang tinggi. Hasil yang sama juga diperhatikan dalam spektrum penyerapan AAG (Rajah 4.7A dan Rajah 4.7B), namun menghasilkan perbezaan

isyarat penyerapan yang kecil meskipun pada kepekatan yang tinggi. Perubahan spektrum serapan ini juga diperhatikan dalam beberapa kajian (Abubakar et al. 2024; Xu et al. 2017), yang menunjukkan perbezaan spektrum bagi larutan campuran protein–ligan dengan jumlah bacaan spektrum protein bebas dan ligan bebas.



Rajah 4.6 (A) Spektrum penyerapan UV bagi 20  $\mu\text{M}$  HSA tanpa (garis biru penuh) dan dengan kehadiran MTG (6, 12 dan 20  $\mu\text{M}$ ). (B) Spektrum yang dijana daripada penjumlahan nilai penyerapan HSA bebas (20  $\mu\text{M}$ ) dan MTG bebas (6, 12 dan 20  $\mu\text{M}$ ). Garis putus-putus hitam mewakili 20  $\mu\text{M}$  MTG. (C) Graf tindangan membandingkan spektrum dari panel A (garis penuh) dan panel B (garis putus-putus). Warna merah mewakili 6  $\mu\text{M}$  MTG–20  $\mu\text{M}$  HSA, ungu mewakili 12  $\mu\text{M}$  MTG–20  $\mu\text{M}$  HSA dan hijau mewakili 20  $\mu\text{M}$  MTG–20  $\mu\text{M}$  HSA.



Rajah 4.7 (A) Spektrum penyerapan UV bagi 20  $\mu\text{M}$  AAG tanpa (garis biru penuh) dan dengan kehadiran MTG (6, 12 dan 20  $\mu\text{M}$ ). (B) Spektrum yang dijana daripada penjumlahan nilai penyerapan AAG bebas (20  $\mu\text{M}$ ) dan MTG bebas (6, 12 dan 20  $\mu\text{M}$ ). Garis putus-putus hitam mewakili 20  $\mu\text{M}$  MTG. (C) Graf tindanan membandingkan spektrum dari panel A (garis penuh) dan panel B (garis putus-putus). Warna merah mewakili 6  $\mu\text{M}$  MTG–20  $\mu\text{M}$  AAG, ungu mewakili 12  $\mu\text{M}$  MTG–20  $\mu\text{M}$  AAG dan hijau mewakili 20  $\mu\text{M}$  MTG–20  $\mu\text{M}$  AAG.

Walaupun perbezaan dalam nilai penyerapan dalam Rajah 4.6C dan Rajah 4.7C adalah kecil bagi kedua-dua protein plasma ini, namun ia menjelaskan pembentukan kompleks protein–MTG, yang berada dalam keadaan asasnya. Fenomena ini dikaitkan dengan proses pemindahan tenaga dalam kompleks yang melibatkan perubahan dalam

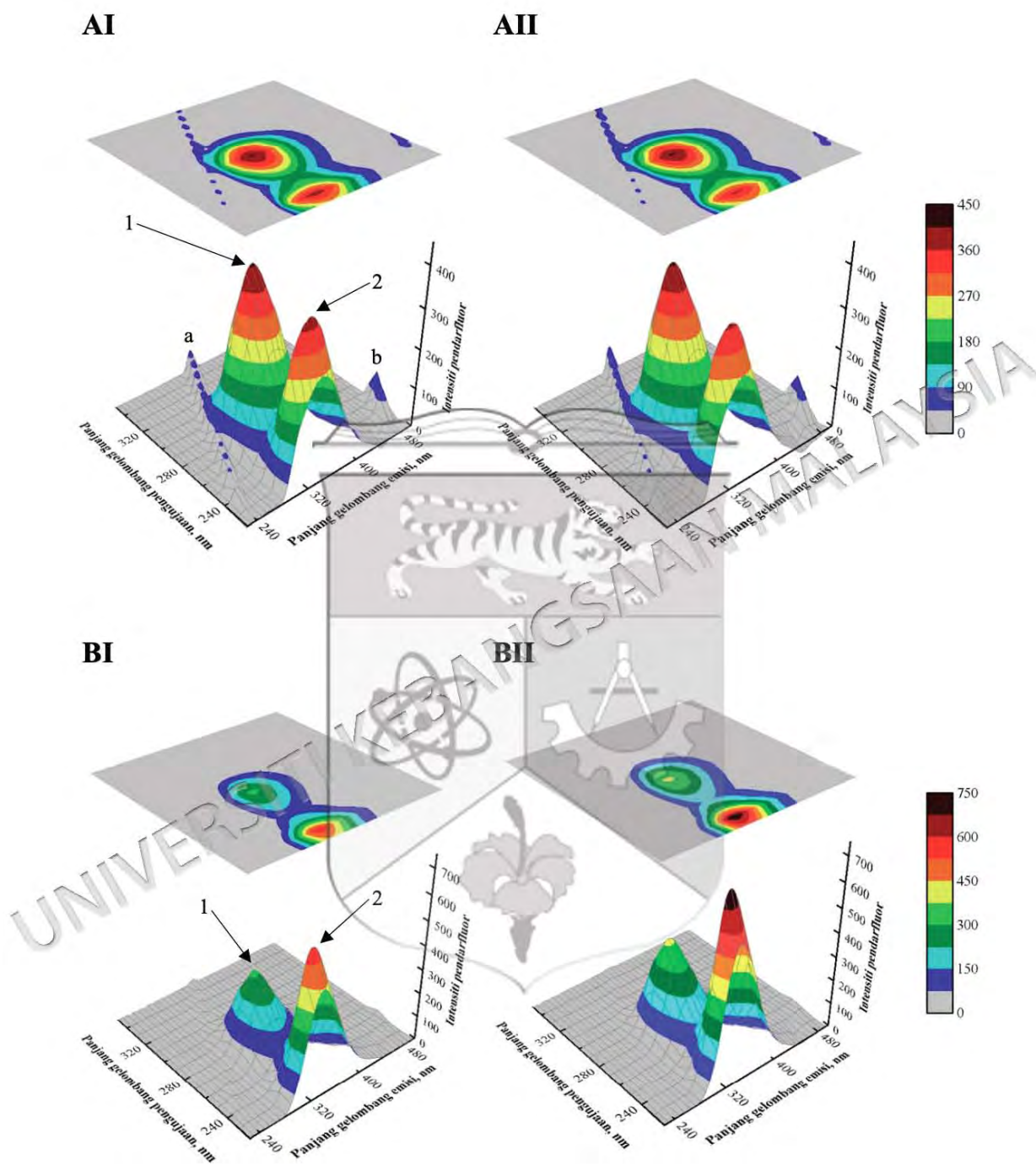
konfigurasi elektronik molekul. Contohnya, pemerhatian ini mungkin menunjukkan susunan  $\pi$ - $\pi$  antara gelang aromatik MTG dan gelang fenil residu aromatik bagi HSA dan AAG (Chaves et al. 2023). Perubahan struktur yang disebabkan oleh pengikatan MTG kepada protein mungkin mempengaruhi struktur protein secara keseluruhan atau hanya residu asid amino aromatik.

Secara keseluruhan, hasil ini telah mengesahkan pembentukan kompleks MTG-HSA dan kompleks MTG-AAG melalui perbandingan spektrum penyerapan bagi larutan campuran (protein-ligan) dan jumlah tambah komponen individu (protein+ligan). Ini selaras dengan dapatan daripada eksperimen pentitratan pendarfluor dan eksperimen ITC sebelum ini yang menunjukkan berlakunya mekanisme interaksi protein-ligan.

#### 4.3.2 Perubahan struktur protein melalui spektroskopi pendarfluor 3D

Pengukuran sampel HSA dan AAG tanpa dan dengan kehadiran MTG menggunakan spektroskopi pendarfluor 3D telah dilakukan untuk mendapatkan pemahaman yang lebih mendalam mengenai perubahan konformasi protein selepas penambahan MTG. Unjuran spektrum pendarfluor 3D dan peta kontur bagi HSA bebas, AAG bebas dan kompleks protein-MTG dalam julat panjang gelombang pengujian dan pancaran yang dikaji adalah digambarkan dalam Rajah 4.8. Ciri-ciri spektrum pendarfluor 3D dari segi kedudukan puncak ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) dan intensiti pendarfluor adalah dinyatakan dalam Jadual 4.4. Data-data ini menunjukkan interaksi MTG mempengaruhi residu asid amino fluorofor protein yang mencerminkan perubahan dalam mikropersekitaran residu ini.

Terdapat dua puncak serakan dalam spektrum pendarfluor 3D, iaitu, a dan b, yang merujuk kepada puncak serakan Rayleigh dan puncak penyerakan peringkat kedua. Puncak serakan Rayleigh ( $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ ), adalah disebabkan oleh penyerakan elastik cahaya pengujian oleh pelarut sampel, molekul yang terlarut dan partikel yang terampai. Manakala, puncak penyerakan peringkat kedua ( $2\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ ), adalah disebabkan oleh artefak instrument yang terjadi akibat transmisi pembelauan peringkat kedua oleh parutan monokromator (Bortolotti et al. 2016). Kedua-dua puncak spektrum pendarfluor ini adalah biasa dalam semua sampel yang tidak mengandungi fluorofor (Bortolotti et al. 2016; Lakowicz 2006).



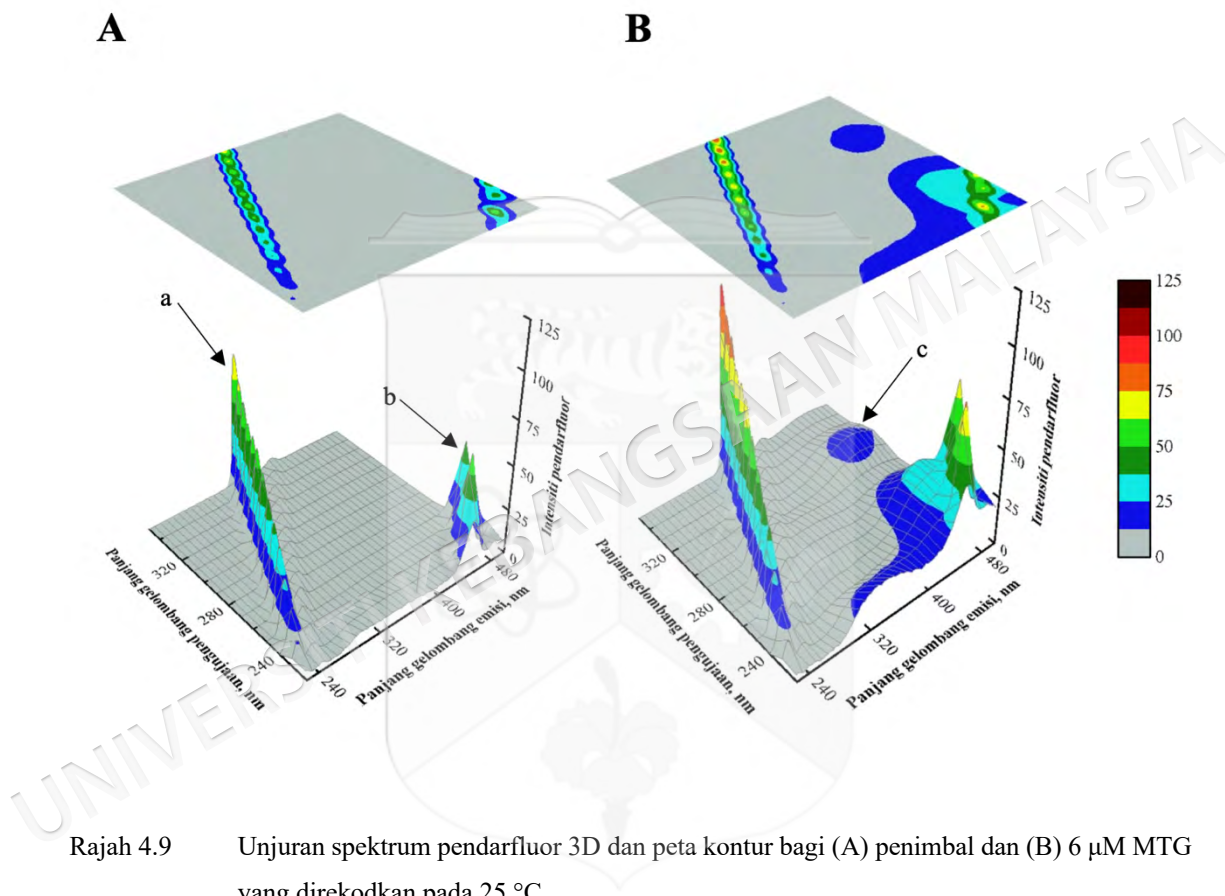
Rajah 4.8 Unjuran spektrum pendarfluoar 3D dan peta kontur bagi (AI) 3  $\mu\text{M}$  HSA, (AII) kompleks MTG–HSA (6  $\mu\text{M}$  MTG + 3  $\mu\text{M}$  HSA), (BI) 3  $\mu\text{M}$  AAG dan (BII) kompleks MTG–AAG (6  $\mu\text{M}$  MTG + 3  $\mu\text{M}$  AAG) yang direkodkan pada 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Jadual 4.4 Data spektrum 3D pendarfluor bagi HSA, AAG, kompleks MTG–HSA dan kompleks MTG–AAG

Interaksi	Puncak	Kedudukan puncak [ $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm/nm)]	Intensiti
3 $\mu$ M HSA	a	250/250→350/350	51.21→57.68
	b	250/500	86.84
	1	280/338	411.19
	2	230/333	384.31
3 $\mu$ M HSA + 6 $\mu$ M MTG	a	250/250 →350/350	50.93→67.83
	b	250/500	76.53
	1	280/339	410.73
	2	230/332	369.85
3 $\mu$ M AAG	1	280/335	315.85
	2	230/334	574.32
3 $\mu$ M AAG + 6 $\mu$ M MTG	1	280/336	392.39
	2	230/335	735.39

Penting untuk ditekankan bahawa kedua-dua puncak ini juga terdapat dalam spektrum pendarfluor 3D bagi penimbal dan MTG bebas seperti yang ditunjukkan di dalam Rajah 4.9. Menariknya, terdapat kehadiran satu puncak baru iaitu puncak c (Rajah 4.9) dalam spektrum pendarfluor 3D bagi MTG ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 310/461$  nm) dengan intensiti pendarfluor sebanyak 17.02. Selain daripada dua puncak penyerakan ini, kehadiran dua puncak baru iaitu puncak 1 dan puncak 2 dalam sampel protein telah ditunjukkan oleh spektrum pendarfluor 3D bagi HSA pada Rajah 4.8AI dan AAG pada Rajah 4.8BI. Puncak

1 dan puncak 2 mewakili ciri-ciri pendarfluor intrinsik yang disebabkan oleh kehadiran residu Trp dan Tyr dalam komposisi protein HSA dan AAG. Ini melibatkan transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  (Bortolotti et al. 2016), iaitu pergerakan elektron dari orbital pengikat ke orbital anti-pengikat  $\pi$  apabila diuja dengan cahaya UV, yang menghasilkan penyerapan spesifik bagi setiap residu.



Rajah 4.9 Unjuran spektrum pendarfluor 3D dan peta kontur bagi (A) penimbal dan (B) 6  $\mu$ M MTG yang direkodkan pada 25 °C.

Perubahan dalam struktur tertier protein apabila berkompleks dengan MTG telah menghasilkan kesan berbeza terhadap struktur dan sifat pendarfluor kedua-dua protein. Kompleks MTG–HSA dengan nisbah molar 2:1 hanya menghasilkan penurunan intensiti pendarfluor bagi sebanyak 3.76% bagi puncak 2, manakala tiada perubahan yang ketara dilihat pada puncak 1 (Rajah 4.8AII). Penurunan intensiti ini menunjukkan bahawa pengikatan MTG tidak menyebabkan perubahan yang ketara dalam mikroperskitaran residu fluorofor dalam HSA. Manakala, Rajah 4.8BII menunjukkan kompleks MTG–AAG

dalam nisbah molar yang sama telah menyebabkan peningkatan intensiti pendarfluor bagi puncak 1 (sebanyak 19.51%) dan puncak 2 (sebanyak 21.85%). Perubahan ini menunjukkan bahawa pengikatan MTG pada AAG memberikan kesan ketara terhadap pendarfluor intrinsik Trp dan Tyr, berbanding pengikatannya pada HSA. Ini sekaligus menjelaskan bahawa interaksi MTG dengan AAG telah menyebabkan perubahan dalam dinamik protein terutamanya sekitar residu-residu fluorofor.

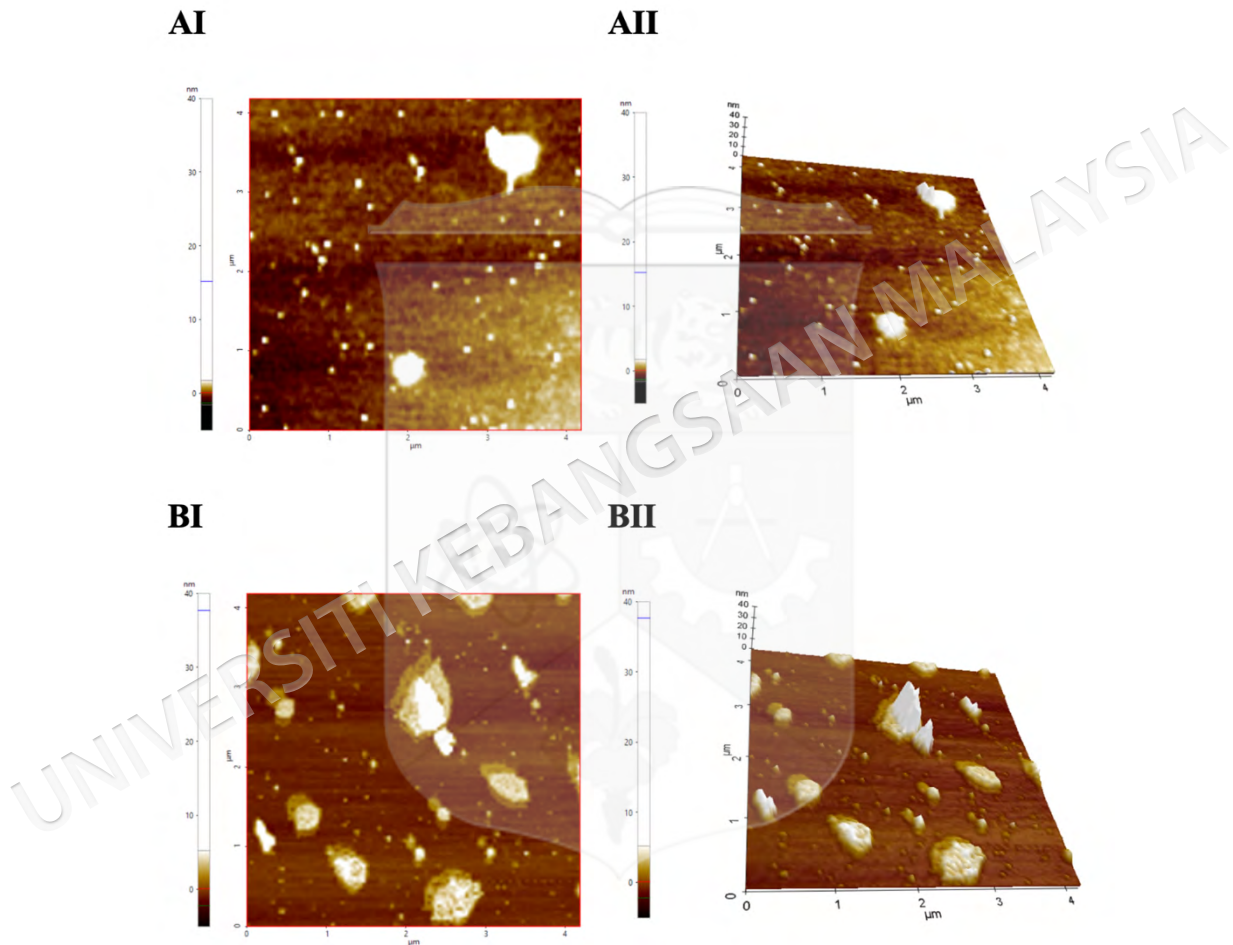
Sebagai rumusan, dapatan ini adalah sejajar dengan dapatan yang diperoleh menerusi kajian spektroskopi pendarfluor yang dijelaskan sebelum ini berkaitan perubahan struktur protein dan interaksi protein–ligan. Perubahan yang ketara di sekitar residu Trp AAG telah berlaku semasa berkompleks dengan MTG, yang seterusnya boleh mempengaruhi struktur dan fungsi AAG secara keseluruhannya dalam konteks biologi dan farmakologi.

#### **4.3.3 Kesan MTG terhadap pengagregatan HSA dan AAG melalui analisis AFM**

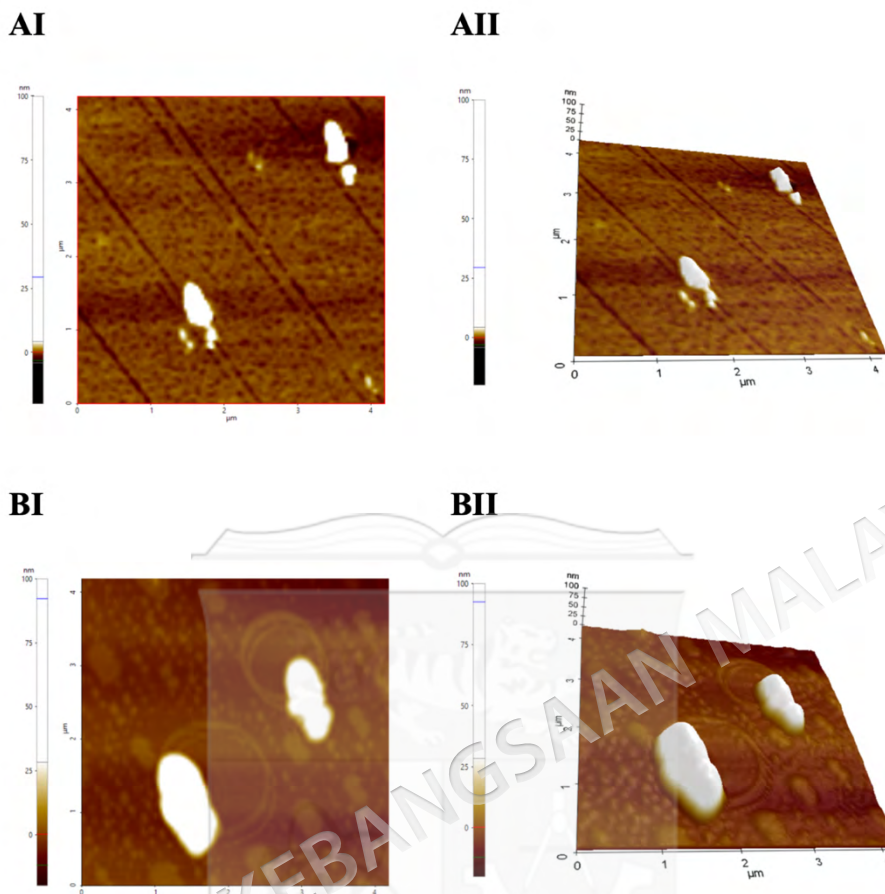
AFM ialah alat analitik cekap yang berupaya untuk menghasilkan imej pada skala nanometer dan digunakan dalam pelbagai aplikasi biologi untuk pemahaman mendalam mengenai struktur dan kelakuan protein (Duf r ne et al. 2017). Maka, perubahan topologi permukaan protein plasma dan kompleksnya dengan MTG divisualisasi dan dianalisis menggunakan alat AFM dengan saiz imej sebesar  $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ . Imej topografi 2D dan 3D AFM untuk HSA natif dan kompleks MTG–HSA ditunjukkan di dalam Rajah 4.10A dan Rajah 4.10B, manakala untuk AAG natif dan kompleks MTG–AAG pula ditunjukkan di Rajah 4.11A dan Rajah 4.11B.

Sampel HSA natif (Rajah 4.10A) menunjukkan sejumlah taburan bersaiz kecil yang berketinggian sekitar  $3.304 \pm 0.35 \text{ nm}$  dan dua pembentukan yang lebih besar (ketinggian sekitar 13.883 nm dan 3.935 nm). Sementara, Rajah 4.11A menunjukkan sampel AAG natif yang mempunyai dua pembentukan dengan dimensi besar (ketinggian sekitar 27.515 nm dan 20.859 nm). Penambahan MTG telah menghasilkan bentuk imej dengan dimensi yang lebar (Rajah 4.10B dan Rajah 4.11B), yang mencerminkan peningkatan saiz agregat HSA dan AAG di atas substrat mika. Sampel kompleks MTG–HSA (Rajah 4.10B) menunjukkan

peningkatan dimensi dengan lebar sekitar  $\sim 0.3\text{--}0.8$  nm dan tinggi sekitar  $\sim 4.3\text{--}14$  nm dan kehadiran satu agregat dengan ketinggian 37.633 nm. Ketinggian agregat sampel bagi kompleks MTG–AAG juga adalah lebih besar berbanding sampel AAG bebas, dan dua bentuk imejnya diilustrasikan dalam Rajah 4.11B dengan ketinggian masing-masing sebanyak 85.781 nm dan 56.633 nm.



Rajah 4.10 Imej topografi AFM 2D dan 3D bagi (AI) HSA bebas dan (BI) kompleks MTG–HSA. Imej topologi AFM 3D yang sepadan ditunjukkan pada (AII) bagi HSA bebas dan (BII) kompleks MTG–HSA. Sampel telah diimbas dalam mod torehan dengan saiz imbasan  $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$ .



Rajah 4.11 Imej topografi AFM 2D bagi (AI) AAG bebas dan (BI) kompleks MTG–AAG. Imej topologi AFM 3D yang sepadan ditunjukkan pada (AII) bagi AAG bebas dan (BII) kompleks MTG–AAG. Sampel telah diimbas dalam mod torehan dengan saiz imbasan  $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$ .

Beberapa kajian lepas juga menunjukkan topologi protein plasma meningkat disebabkan oleh penambahan ligan (Abubakar et al. 2022; Dubey et al. 2018). Ini menerangkan fenomena pengagregatan (flokulasi) dan penglibatan interaksi hidrofobik dalam pengkompleksan protein–MTG. Peningkatan kehidrofobikan merupakan faktor yang menyumbang kepada pengagregatan protein, yang berlaku apabila protein membentuk kompleks stabil dengan mengurangkan kawasan permukaan yang terdedah dengan pelarut. Kesimpulannya, dimensi imej topologi bagi kompleks MTG–HSA dan MTG–AAG adalah berbeza dari molekul protein natif, yang mungkin disebabkan oleh

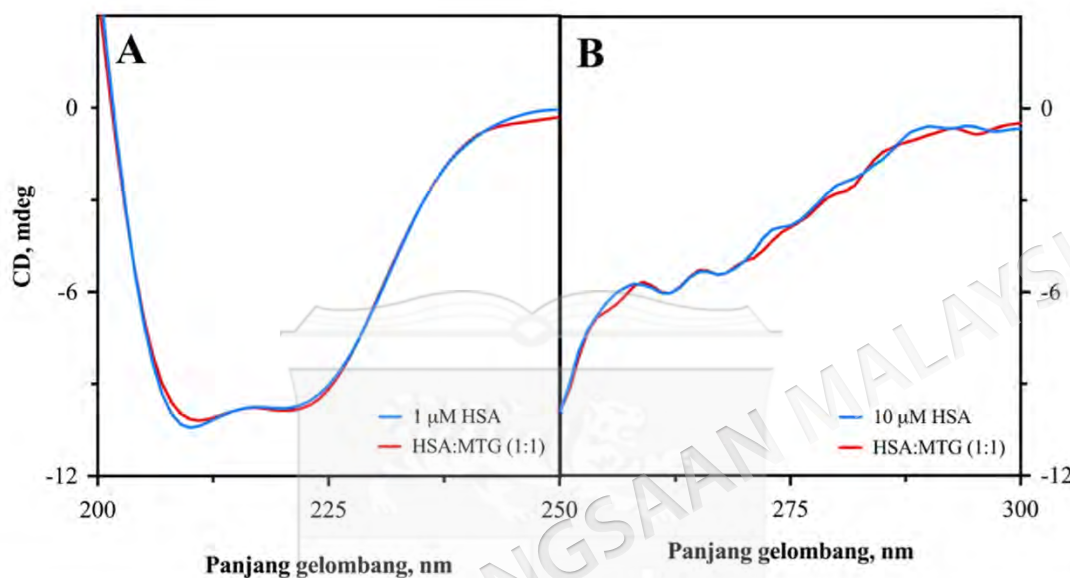
pengkonjugatan MTG dengan HSA dan AAG. Saiz agregat yang lebih besar pada substrat mika mencadangkan penglibatan interaksi hidrofobik yang ketara antara HSA dan AAG dengan MTG.

#### 4.3.4 Kesan pengikatan MTG ke atas struktur protein melalui analisis spektrum CD

Perubahan konformasi protein yang berkemungkinan berlaku disebabkan oleh pengikatan ligan pada protein boleh dikenalpasti menggunakan spektroskopi CD. Penyerapan spektrum CD UV-jauh (200–250 nm) sesuatu protein memberikan informasi mengenai struktur sekunder (heliks- $\alpha$  atau lembaran- $\beta$ ). Penyerapan ini adalah berdasarkan dua jenis transisi elektronik oleh kromofor amida; transisi  $\eta \rightarrow \pi^*$  yang menunjukkan isyarat negatif pada 222 nm dan transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  yang menunjukkan isyarat pada panjang gelombang lebih rendah (190–210 nm) (Linhares & Ramos 2023; Miles, Janes & Wallace 2021). Selain itu, spektroskopi CD juga memberikan maklumat mengenai struktur tertier protein seperti rantaian asid amino aromatik dan ikatan dwisulfida yang digambarkan oleh isyarat spektrum CD UV-dekat (250–300 nm) (Daviter, Chmel & Rodger 2013; Kelly, Jess & Price 2005). Residu asid amino aromatik menunjukkan isyarat CD yang berkaitan dengan transisi elektronik  $\pi \rightarrow \pi^*$  dalam panjang gelombang UV-dekat (Linhares & Ramos 2023). Untuk memahami kesan interaksi MTG ke atas struktur HSA dan AAG, pengukuran spektrum CD bagi HSA dan AAG tanpa dan dengan kehadiran MTG telah dijalankan.

Dalam kajian ini, spektrum CD UV-jauh bagi HSA tanpa dan dengan kehadiran MTG (1  $\mu\text{M}$ ) ditunjukkan dalam Rajah 4.12A dan anggaran peratusan komponen struktur sekunder adalah disenaraikan dalam Jadual 4.5. Spektrum CD UV-jauh bagi HSA natif menunjukkan dua minimum pada panjang gelombang 208 nm dan 222 nm, yang menggambarkan kehadiran struktur heliks- $\alpha$  (Abubakar et al. 2024; Linhares & Ramos 2023; Shahlaei et al. 2015). Kajian kristalografi terdahulu telah melaporkan komposisi heliks- $\alpha$  yang hampir sama (67%) (Carter & Ho 1994), dengan nilai 64.4% yang diperoleh daripada data kajian ini. Perubahan kecil dalam isyarat CD protein diperhatikan apabila MTG ditambahkan, dengan komposisi heliks- $\alpha$  sedikit menurun kepada 61.25%. Ini disertai dengan kemunculan kecil struktur lembaran- $\beta$  (1.35%) yang tidak dapat dikesan dalam

keadaan asal, dan sedikit penurunan dalam kandungan  $\beta$ -turn daripada 8.30% kepada 7.25%. Secara ringkasnya, hasil ini mencadangkan bahawa MTG hanya menyebabkan penyusunan semula yang kecil terhadap struktur sekunder HSA.



Rajah 4.12 Kesan interaksi MTG–HSA ke atas struktur sekunder dan tertier HSA. Spektrum UV-jauh (A) dan UV-dekat (B) bagi HSA dan campuran MTG–HSA. Kepekatan HSA adalah  $1 \mu\text{M}$  bagi pengukuran CD UV-jauh dan  $10 \mu\text{M}$  bagi UV-dekat.

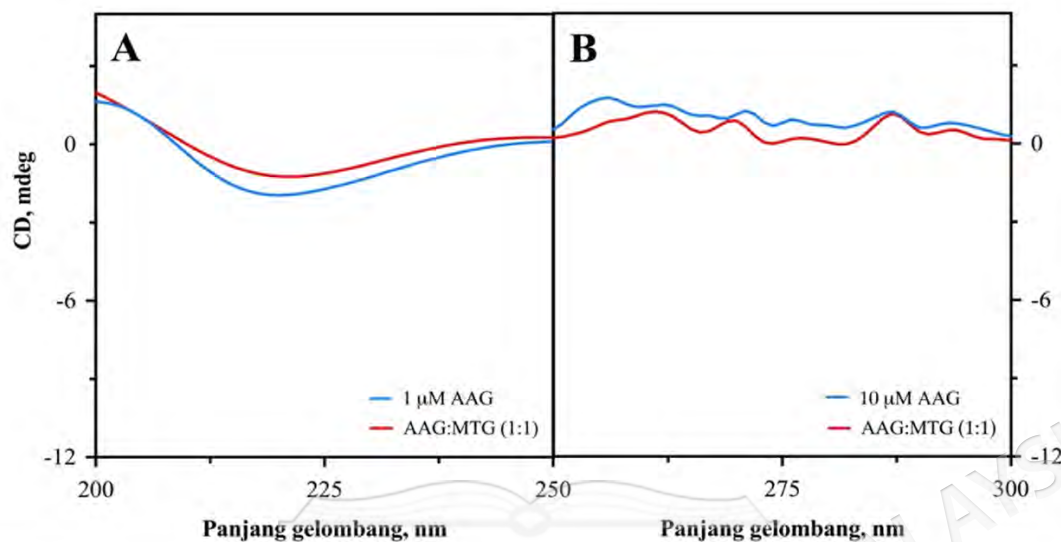
Jadual 4.5 Komposisi struktur sekunder bagi HSA dalam keadaan natif dan dengan kehadiran MTG

Struktur	$1 \mu\text{M}$ HSA	$1 \mu\text{M}$ HSA + $1 \mu\text{M}$ MTG
Heliks- $\alpha$ (biasa dan terubah)	$(64.4 \pm 0.37)$	$(61.25 \pm 1.35)$
Lembaran- $\beta$ (selari dan anti-selari)	$(0.00 \pm 0.00)$	$(1.35 \pm 0.45)$
$\beta$ -turn	$(8.30 \pm 0.91)$	$(7.25 \pm 0.05)$
Lain-lain	$(28.15 \pm 0.55)$	$(28.95 \pm 2.37)$

Spektrum CD UV-dekat bagi HSA tanpa dan dengan kehadiran MTG (10  $\mu\text{M}$ ) adalah digambarkan dalam Rajah 4.12B. Spektrum CD UV-dekat bagi HSA natif menunjukkan kehadiran dua puncak negatif pada sekitar 261 nm dan 269 nm yang mendemonstrasikan kehadiran ikatan dwisulfida dan kromofor aromatik protein (Abubakar et al. 2022; Rehman et al. 2024). Fleksibiliti dan kestabilan konformasi protein HSA dipengaruhi oleh kehadiran 17 pasang titian dwisulfida yang disumbangkan oleh 34 residu asid amino sisteina (kecuali Cys-34) (Paris et al. 2012; Sugio et al. 1999). Secara khusus, residu asid amino aromatik Trp (1), Phe (31) dan Tyr (18) memainkan peranan penting dalam profil serapan spektrum CD UV-dekat (Peters 1985). Menariknya, kehadiran MTG tidak menghasilkan perubahan yang ketara pada UV-dekat HSA. Secara ringkasnya, hasil ini menjelaskan bahawa kehadiran MTG tidak memberikan kesan yang ketara terhadap struktur keseluruhan HSA.

Eksperimen yang serupa telah dijalankan untuk menyiasat kesan interaksi MTG terhadap struktur AAG. Dalam kajian ini, spektrum CD UV-jauh bagi AAG tanpa dan dengan kehadiran MTG (1  $\mu\text{M}$ ) ditunjukkan dalam Rajah 4.13A dan anggaran peratusan komponen struktur sekunder disenaraikan dalam Jadual 4.6. Spektrum CD UV-jauh bagi protein AAG natif menunjukkan puncak negatif pada 218 nm, menggambarkan kehadiran struktur lembaran- $\beta$  protein (Hu et al. 2024; Liu et al. 2024). Hasil eksperimen ini menunjukkan protein AAG natif mempunyai komposisi lembaran- $\beta$  (41.4%) yang hanya sedikit berbeza daripada analisis kristalografi struktur sekunder AAG yang menunjukkan komposisi sebanyak 39.3% (Schönfeld et al. 2008). Kehadiran MTG mengubah komposisi lembaran- $\beta$  kepada 35.85% dengan peningkatan kecil struktur  $\beta$ -turn daripada 18.05% kepada 18.55%. Oleh itu, hasil ini menerangkan bahawa kehadiran MTG menyebabkan perubahan yang minimum dalam struktur sekunder protein ini.

Bagi spektrum CD UV-dekat (Rajah 4.13B), terdapat dua puncak negatif diperhatikan pada 274 dan 282 nm dan tiga puncak positif pada 257, 278 dan 287 nm (Nishi et al. 2004). Ciri-ciri spektrum CD UV-dekat ini menjelaskan kehadiran asid amino aromatik protein AAG yang disumbangkan oleh residu Trp, Tyr dan Phe yang berbeza kuantitinya di antara kedua-dua varian AAG. Spektrum CD UV-dekat bagi AAG natif tidak



Rajah 4.13 Kesan interaksi MTG–AAG ke atas struktur sekunder dan tertier AAG. Spektrum UV-jauh (A) dan UV-dekat (B) bagi AAG dan campuran MTG–AAG. Kepekatan AAG adalah 1  $\mu\text{M}$  bagi pengukuran CD UV-jauh dan 10  $\mu\text{M}$  bagi UV-dekat.

Jadual 4.6 Komposisi struktur sekunder bagi AAG dalam keadaan natif dan dengan kehadiran MTG

Struktur	1 $\mu\text{M}$ AAG	1 $\mu\text{M}$ AAG + 1 $\mu\text{M}$ MTG
Heliks- $\alpha$ (biasa dan terubah)	(0.00 $\pm$ 0.00)	(0.40 $\pm$ 0.46)
Lembaran- $\beta$ (selari dan anti-selari)	(41.40 $\pm$ 4.95)	(35.85 $\pm$ 5.73)
( $\beta$ -turn)	(18.05 $\pm$ 1.06)	(18.55 $\pm$ 2.47)
Lain-lain	(40.55 $\pm$ 0.21)	(45.10 $\pm$ 2.69)

menunjukkan isyarat CD minimum pada sekitar 260 nm, seperti dijangkakan kerana hanya mempunyai dua titian dwisulfida (Kelly, Jess & Price 2005). Penambahan MTG ke dalam larutan protein AAG memberikan kesan minimum terhadap struktur protein, namun lebih signifikan berbanding HSA berdasarkan pemerhatian pada spektrum UV-jauh dan UV-

dekat. Perbezaan ini boleh dikaitkan dengan saiz AAG (41 kDa) yang lebih kecil dan fleksibel berbanding HSA (66 kDa), yang mungkin mempengaruhi perubahan struktur AAG dengan ketara. Sekaligus, ini menerangkan bahawa interaksi MTG mungkin memberikan perubahan terhadap struktur sekunder mahupun tertier protein AAG.

Bentuk spektrum CD bagi kedua-dua protein yang berlainan menerangkan perbezaan komponen struktur sekunder dan juga struktur tertier. Jenis struktur sekunder yang dipraktikkan oleh rantaian polipeptida (heliks- $\alpha$  atau lembaran- $\beta$ ) bergantung pada sudut dihedron ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) antara residu bersebelahan dalam rantai polipeptida (Miles, Janes & Wallace 2021). Spektrum CD untuk lembaran- $\beta$  bagi AAG (Rajah 4.13A) lebih berbeza dibandingkan dengan heliks- $\alpha$  bagi HSA (Rajah 4.12A), kerana lembaran- $\beta$  boleh wujud dalam konformasi selari, anti-selari atau campuran dan boleh memperlihatkan susunan berputar yang bervariasi (Linhares & Ramos 2023; Micsonai et al. 2022). Magnitud spektrum CD UV dekat protein menunjukkan perbezaan bagi kedua-dua protein (Rajah 4.12B dan Rajah 4.13B) kerana dipengaruhi oleh jumlah setiap jenis asid amino aromatik yang hadir, mobiliti, sifat persekitaran (ikatan hidrogen, kumpulan berkutub dan kebolehkutuban) serta disposisi ruang dalam protein (Kelly, Jess & Price 2005).

Perubahan konformasi protein disebabkan pengikatan MTG ini boleh mempengaruhi fungsi biologi dan kelakuan protein plasma ini dalam sistem peredaran. Hasil daripada spektroskopi CD menunjukkan kesan tidak ketara terhadap struktur tertier HSA, namun memberi kesan yang kecil terhadap struktur sekunder dan tertier AAG apabila berkompleks dengan MTG. Data ini adalah selari dengan data pentitratan pendarfluor yang menunjukkan berlakunya anjakan kecil pada pancaran maksimum dengan kehadiran MTG yang diperhatikan bagi spektrum pendarfluor AAG, tetapi tidak pada HSA. Perubahan mikrosekitaran fluorofor (residu Trp) bagi AAG menyumbang kepada perubahan sifat pendarfluornya yang dijangkakan boleh mempengaruhi fungsi biologi protein ini. Pemerhatian yang diperoleh daripada hasil CD menjangkakan aktiviti enzimatik HSA seperti esterase dan tioesterase (Kragh-Hansen 2016), mungkin tidak terjejas kerana konformasi adalah hampir menyerupai protein natif. Namun, alterasi terhadap struktur AAG setelah pengikatan MTG mungkin memberi sedikit kesan terhadap fungsi biologi

protein fasa akut positif ini. Peranan AAG seperti agen imunomodulasi dalam tindak balas imun (Hochepped et al. 2003), boleh terganggu disebabkan perubahan strukturnya.

Kesimpulannya, hasil ini menjelaskan bahawa fungsi biologi HSA berkemungkinan tidak terganggu akibat interaksi dengan MTG dan boleh menjalankan aktiviti asalnya dengan keberkesanan yang dijangkakan. Namun, pengikatan MTG pada AAG memberi kesan terhadap strukturnya, yang boleh memberi implikasi kepada fungsinya.

#### **4.4 LOKASI TAPAK PENGIKATAN SEBATIAN MTG DAN 7-OH-MTG PADA HSA DAN AAG**

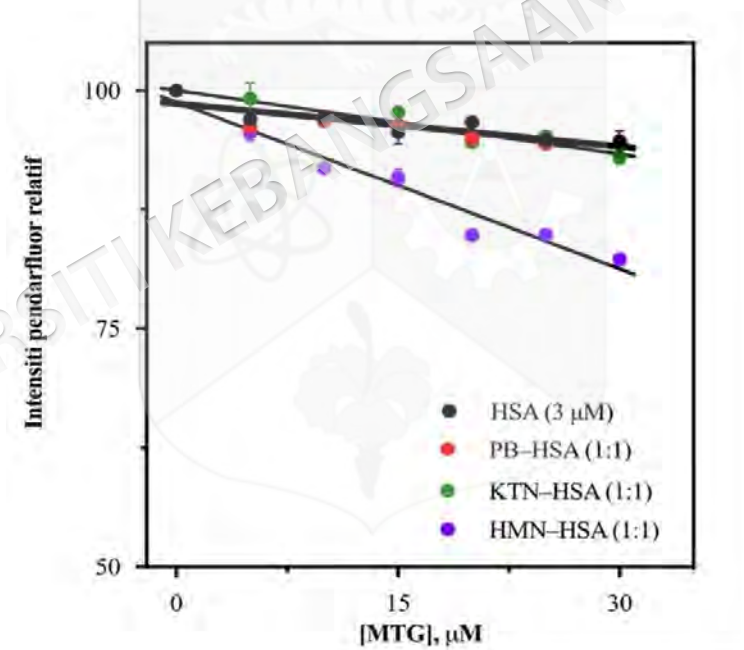
Lokasi tapak pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada HSA dan AAG telah dianalisis menggunakan simulasi dok molekul. Eksperimen sesaran dadah kompetitif juga dijalankan untuk menentukan tapak pengikatan spesifik bagi MTG pada HSA. Penyesaran dadah kompetitif adalah berkaitan dengan interaksi dadah-dadah, dimana persaingan antara dadah untuk tapak pengikatan yang sama pada protein boleh mengakibatkan peningkatan kepekatan dadah bebas. Maklumat ini berguna untuk menilai keberkesanan terapi, kesan sampingan dan ketoksikan, yang penting dalam pembangunan dadah daripada ketum yang efektif.

##### **4.4.1 Kajian penyesaran dadah kompetitif**

Penentuan lokasi pengikatan MTG telah dijalankan melalui kajian penyesaran dadah menggunakan ligan penanda berafiniti tinggi kepada tapak pengikatan utama pada HSA, iaitu fenilbutazon (PB) untuk tapak I di subdomain IIA, ketoprofen (KTN) untuk tapak II di subdomain IIIA dan hemin (HMN) untuk tapak III di subdomain IB (Rajah 4.14). Ligan-ligan penanda yang berbeza dengan variasi dari segi struktur dan sifat kimia dipilih untuk pemerhatian yang komprehensif terhadap tapak-tapak pengikatan HSA.

Rajah 4.14 menggambarkan hasil pentitratan pendarfluor yang dijalankan ke atas larutan HSA dan kompleks ligan penanda-HSA (1:1), dengan peningkatan kepekatan MTG (5–30  $\mu\text{M}$ ). Menariknya, setelah kehadiran MTG, kedua-dua larutan campuran PB-HSA

dan KTN–HSA menunjukkan pemelindapan intensiti pendarfluor pada  $\sim 340$  nm yang hampir sama seperti HSA bebas. Ini menandakan bahawa interaksi kedua-dua ligan penanda ini dengan HSA di dalam saku pengikatannya adalah tidak terganggu oleh kehadiran MTG. Ini berbeza dengan kompleks HMN–HSA, di mana berlaku penurunan isyarat pendarfluor disebabkan oleh kehadiran MTG. Ini mencadangkan bahawa pengikatan HMN kepada HSA di tapak III mempengaruhi pengikatan MTG. Oleh itu, boleh ditafsirkan bahawa tapak III mungkin merupakan lokasi pengikatan bagi MTG. Ini disokong oleh fakta bahawa hanya HMN yang mempengaruhi pengikatan MTG pada HSA, tetapi tidak ligan penanda lainnya (PB dan KTN). Walau bagaimanapun, ia juga boleh diperdebatkan bahawa jika diandaikan HMN dan MTG bersaing untuk tapak pengikatan yang sama pada HSA, ini sepatutnya mengakibatkan penurunan keamatan pendarfluor yang lebih kecil berbanding HSA bebas kerana tapak tersebut sukar diakses oleh MTG.



Rajah 4.14 Penyesaran ligan penanda dari tapak pengikatan HSA oleh MTG (5–30  $\mu\text{M}$  dengan selang 5  $\mu\text{M}$ ) yang diperhatikan melalui perubahan intensiti pendarfluor relatif (FI) HSA (3  $\mu\text{M}$ ) dan kompleksnya (1:1) dengan PB untuk tapak I, KTN untuk tapak II dan HMN untuk tapak III. Puncak pancaran maksimum adalah HSA, PB–HSA, KTN–HSA, dan HMN–HSA adalah pada 341, 340, 340, dan 334 nm, masing-masing.  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm.

Oleh demikian, penyelidikan lebih lanjut dan pendekatan pengkomputeran diperlukan untuk pensahihan data yang dilaporkan dalam kajian ini. Maka, analisis dok molekul dilakukan untuk mengenalpasti tapak pengikatan MTG dan mengesahkan dapatan kajian sesaran dadah kompetitif. Ini penting untuk mendapatkan pemahaman yang lebih terperinci tentang mekanisme pengikatan MTG dengan albumin serta potensi interaksi dengan dadah-dadah lainnya.

#### 4.4.2 Analisis simulasi molekul mengedok

Analisis dok molekul dijalankan menggunakan pakej perisian AutoDock untuk meramalkan tapak pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada HSA dan kedua-dua varian AAG (varian F1\*S dan A). Simulasi dok MTG dan 7-OH-MTG pada HSA secara rawak dijalankan dengan 1000 output, sebelum simulasi pengedokan pada tapak spesifik (tapak pengikatan I, II dan III) sebanyak 100 output dilakukan. Bagi kedua-dua varian AAG, simulasi dok molekul dilakukan secara rawak (1000 output) sahaja kerana hanya terdapat satu tapak pengikatan yang menjadi lokus pengikatan dadah. Pemahaman mengenai variasi konformasi kompleks protein–ligan diketahui dengan analisis hasil kluster menggunakan toleransi RMSD sebanyak 2.0 Å bagi semua protein plasma. Jadual 4.7 menunjukkan tenaga pengikatan terendah (pengikatan paling kuat) bagi pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG kepada kedua-dua protein plasma yang diperoleh menerusi hasil dok secara rawak dan spesifik.

##### a. Dok molekul MTG dan 7-OH-MTG dengan HSA

Analisis kluster bagi dok rawak MTG–HSA memperoleh sebanyak 439 kluster konformer tunggal dan 197 kluster multi-konformer daripada 1000 hasil output (Rajah 4.15A). Kluster dengan populasi tertinggi adalah diwakili oleh konformer yang mengikat pada subdomain IIA HSA dengan 22 konformer. Namun, kluster dengan tenaga pengikatan terendah ( $<-8.5$  kcal mol<sup>-1</sup>) didominasi oleh konformasi MTG yang mengedok pada subdomain IB HSA. Berdasarkan identiti asid amino, lokasi dok konformer MTG ini dikenalpasti mengandungi tapak pengikatan dadah III. Ini menandakan kecenderungan bagi MTG untuk mengikat dengan tapak pengikatan dadah III pada subdomain IB HSA dengan kestabilan yang tinggi.

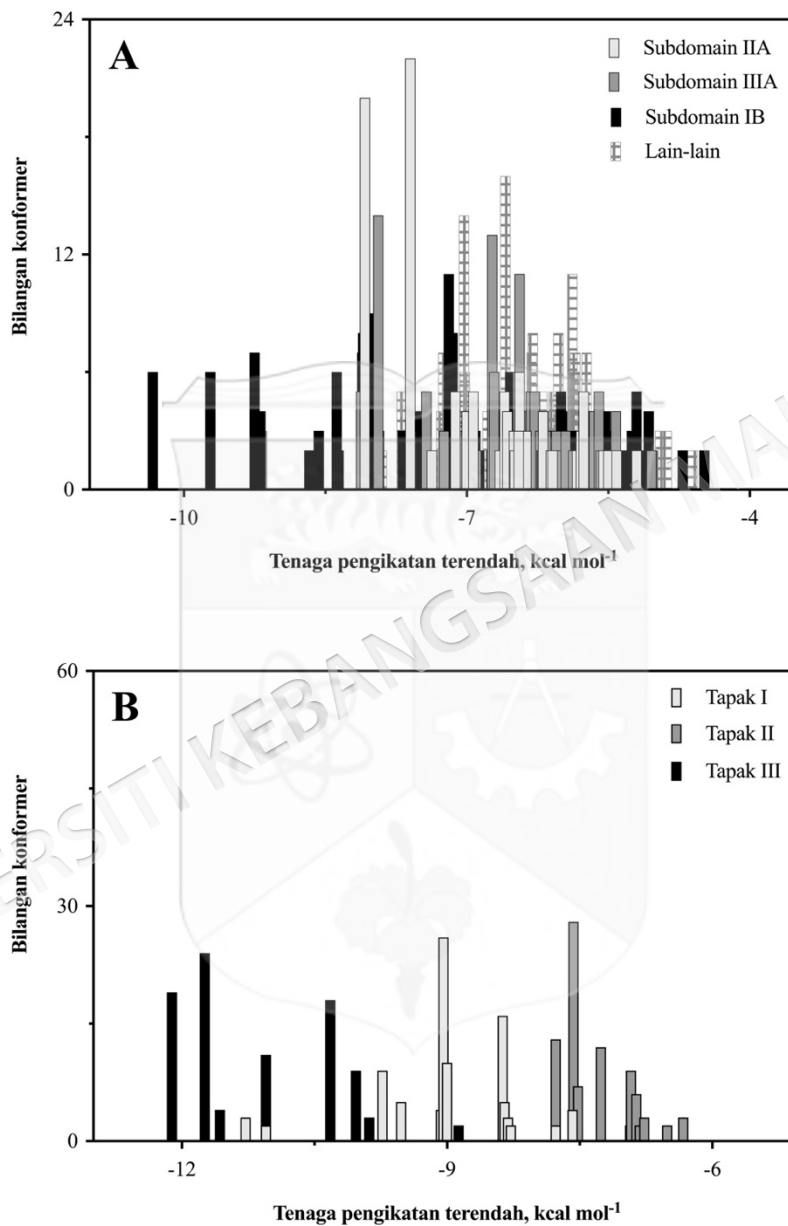
Jadual 4.7 Tenaga pengikatan terendah bagi pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada HSA dan kedua-dua varian AAG

	Tenaga pengikatan terendah (kcal mol <sup>-1</sup> )	
	MTG	7-OH-MTG
<b>Analisis dok secara rawak (1000 output)</b>		
HSA	-10.33	-9.58
AAG varian F1*S	-10.80	-9.95
AAG varian A	-10.18	-10.44
<b>Analisis dok secara spesifik (100 output)</b>		
Tapak I : Subdomain IIA HSA	-11.28	-10.61
Tapak II : Subdomain IIIA HSA	-7.77	-8.21
Tapak III : Subdomain IB HSA	-12.11	-12.11

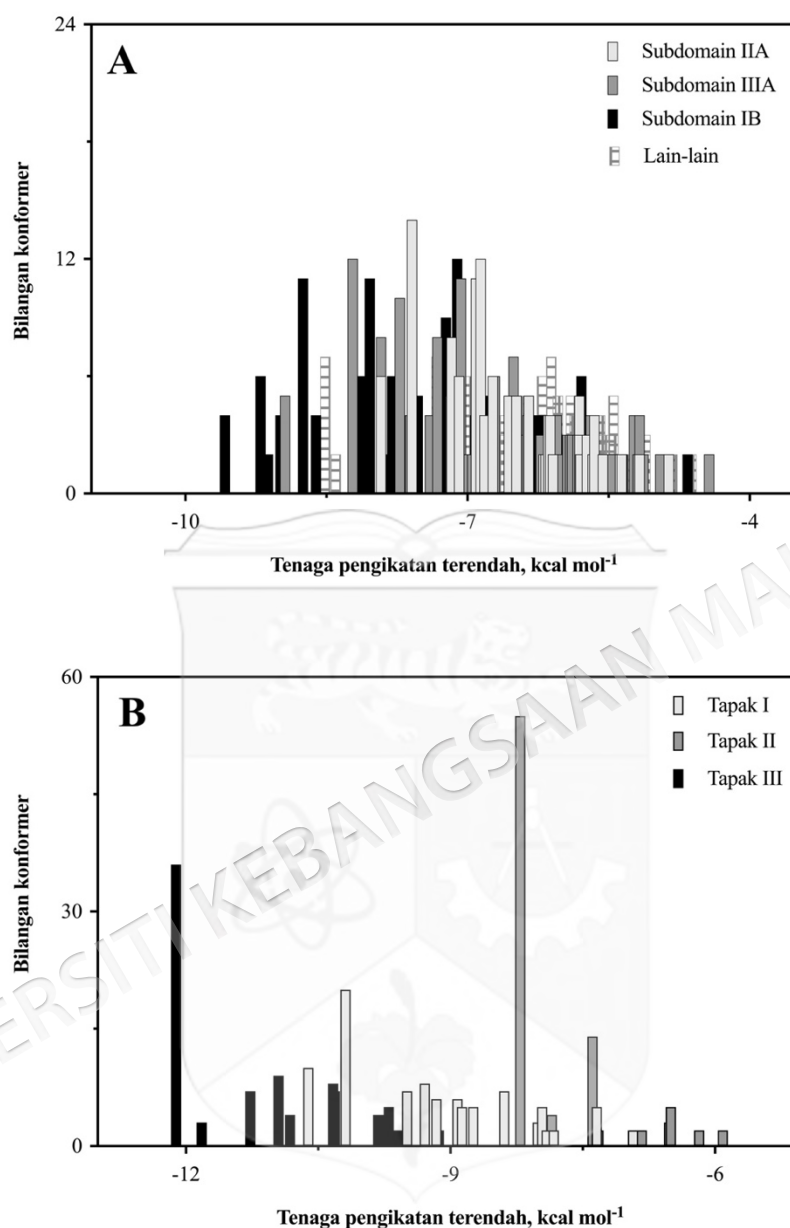
Dapatan ini disokong oleh analisis pengedokan spesifik-tapak susulan (Rajah 4.15B), yang menunjukkan pola pengelompokan yang jelas untuk tiga tapak pengikatan utama HSA. Hasil analisis menunjukkan bahawa pengedokan pada tapak pengikatan III adalah paling stabil dari segi tenaga pengikatan, diikuti oleh tapak pengikatan I dan tapak pengikatan II.

Di samping itu, pola serupa juga telah diperhatikan bagi pengedokan 7-OH-MTG kepada HSA. Hasil dok rawak kompleks 7-OH-MTG-HSA mendapati sejumlah 471 kluster konformer tunggal dan 187 kluster multi-konformer (Rajah 4.16A). Daripada 187 kluster multi-konformer yang dihasilkan kluster yang paling stabil dengan tenaga pengikatan terendah sebanyak  $<-9$  kcal mol<sup>-1</sup> adalah khusus untuk pengikatan 7-OH-MTG pada subdomain IB HSA. Demikian juga, hasil pengedokan spesifik-tapak seperti di dalam Rajah 4.16B, dengan jelas menunjukkan kecenderungan 7-OH-MTG untuk mengikat kepada tapak III HSA berdasarkan tenaga pengikatan dan populasi kluster. Persamaan lokasi tapak pengikatan yang diramalkan bagi kedua-dua sebatian pada HSA adalah telah

dijangka berdasarkan persamaan struktur mereka yang hanya berbeza dengan tambahan satu kumpulan hidroksil di C7 dalam struktur 7-OH-MTG.



Rajah 4.15 Analisis kluster dok molekul bagi MTG dengan HSA secara (A) rawak dan (B) spesifik. Simulasi dok molekul secara rawak dilakukan dengan 1000 output, manakala simulasi dok secara spesifik dilakukan pada ketiga-tiga tapak pengikatan dadah (tapak I pada subdomain IIA, tapak II pada subdomain IIIA, tapak III pada subdomain IB) dengan 100 output. Analisis ini difokuskan sepenuhnya pada kluster multi-konformer sahaja.

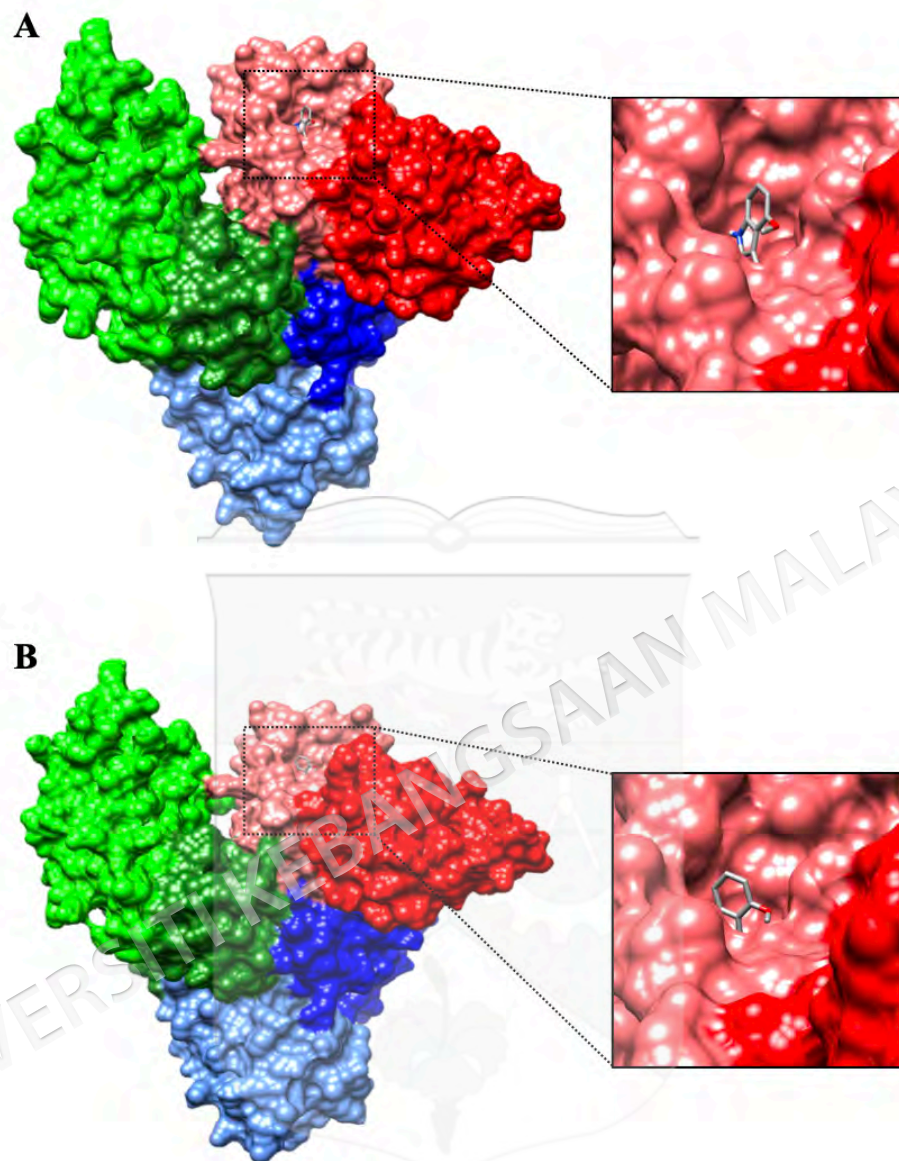


Rajah 4.16 Analisis kluster dok molekul bagi 7-OH-MTG dengan HSA secara (A) rawak dan (B) spesifik. Simulasi dok molekul secara rawak dilakukan dengan 1000 output, manakala simulasi dok secara spesifik dilakukan pada ketiga-tiga tapak pengikatan dadah (tapak I pada subdomain IIA, tapak II pada subdomain IIIA, tapak III pada subdomain IB) dengan 100 output. Analisis ini difokuskan sepenuhnya pada kluster multi-konformer sahaja.

Rajah 4.17A dan Rajah 4.17B menunjukkan visualisasi konformasi dok molekul terbaik (tenaga pengikatan terendah) bagi MTG dan 7-OH-MTG pada HSA berdasarkan

hasil simulasi dok secara rawak. Kedua-dua sebatian psikotropik ini mengedok pada lokasi yang sama iaitu tapak pengikatan III HSA, tetapi dengan orientasi yang berbeza. Sementara seluruh cincin indol MTG menjulur keluar di pintu masuk saku tapak pengikatan (Rajah 4.17A), molekul 7-OH-MTG pula lebih terbenam ke dalam saku ini dengan hanya cincin anisolnya yang kekal di permukaan (Rajah 4.17B). Perbandingan tenaga pengikatan bagi kedua-dua sebatian ini mendedahkan afiniti yang lebih tinggi bagi MTG dengan tenaga pengikatan terendah sebanyak  $-10.33 \text{ kcal mol}^{-1}$  berbanding  $-9.58 \text{ kcal mol}^{-1}$  bagi 7-OH-MTG. Perbezaan ini mungkin disebabkan oleh perbezaan orientasi molekul dalam protein dan interaksi ligan dengan residu-residu spesifik pada HSA. Berdasarkan penyelidikan sebelumnya (Zsila 2013), pengikatan molekul hidrofobik seperti MTG di subdomain IB telah dijangkakan, kerana kebanyakan molekul-molekul hidrofobik juga cenderung mengedok pada subdomain ini.

Subdomain IB adalah sebuah tapak pengikatan yang mempunyai poket pengikatan yang fleksibel dan dianggap sebagai tapak pengikatan dadah utama ketiga HSA. Tapak pengikatan dadah III ini telah terbukti menjadi tempat pengikatan yang bermakna untuk kira-kira 60 sebatian dengan ciri-ciri struktur yang berbeza (Zsila 2013). Ia adalah tapak pengikatan primer untuk sebatian-sebatian endogen seperti bilirubin (dan molekul-molekul berkaitan termasuk biliverdin dan hemin) serta ubat-ubatan seperti lidokaina dan asid fusidik (Zsila 2013). Ia juga tapak pengikatan sekunder bagi beberapa dadah seperti azapropazon, indometasin dan asid triiodobenzoik (Ghuman et al. 2005; Rimac et al. 2017). Menariknya, beberapa sebatian yang mengandungi kumpulan indol yang bertindak sebagai agen psikoaktif seperti dietilamida asid lisergik, dimetiltryptamina dan psilosibin juga diindikasikan berinteraksi dengan HSA di subdomain IB yang mengandungi tapak III (Khastar et al. 2020). Penemuan ini mencadangkan bahawa persamaan struktur sebatian-sebatian psikoaktif ini, terutamanya gelang indol, menyumbang kepada keupayaannya untuk berinteraksi dengan tapak pengikatan tertentu pada HSA. Analisis pengkomputeran melalui simulasi dok molekul ini dapat mengenalpasti lokasi tapak pengikatan pada protein dengan lebih tepat, dan menjelaskan ketidakpastian yang diperoleh daripada eksperimen sesaran dadah kompetitif sebelumnya.



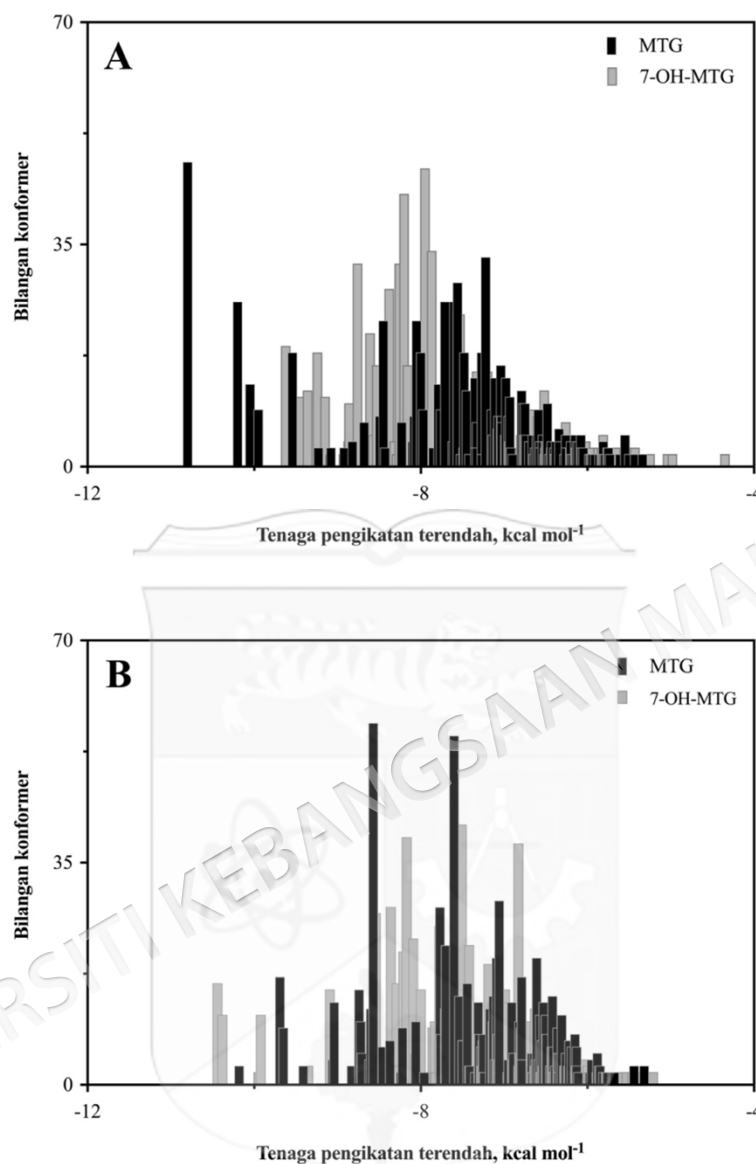
Rajah 4.17 Model molekul mengedok (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG pada HSA (ID PDB: 1BM0) yang menunjukkan orientasi pengikatan bagi konformasi ligan yang paling stabil (kelabu) dengan tenaga pengikatan terkuat. Domain I, II dan III HSA adalah diwarnakan dengan merah, hijau dan biru, masing-masing.

Pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada subdomain IB HSA (tapak III) menjelaskan bahawa interaksi kedua-dua sebatian ketum ini tidak mempengaruhi pengikatan dadah pada tapak yang lain. Misalnya, pengikatan dadah yang berinteraksi kuat pada tapak selain tapak

pengikatan III, seperti CMPF pada tapak I dan asid hipurik pada tapak II tidak terjejas (Sakai, Takadate & Otagiri 1995; Takamura, Maruyama & Otagiri 1997). Sebaliknya, terdapat kemungkinan peningkatan aktiviti farmakologi bagi dadah berafiniti tinggi pada tapak III seperti lidokaina (Ghuman et al. 2005), akibat penyesaran oleh MTG dan 7-OH-MTG yang menyebabkan fraksi bebas dadah ini bertambah. Tambahan juga, penggunaan dadah secara konkumitan dengan sebatian MTG atau 7-OH-MTG boleh dilakukan melibatkan dadah-dadah yang mengikat pada tapak pengikatan dadah selain tapak III. Ini seterusnya memungkinan dadah-dadah lain bersama MTG atau 7-OH-MTG dapat dibawa menuju sasaran terapeutik dan seterusnya menjalankan kesan terapeutiknya dengan berkesan. Dapatan kajian ini dapat memberi maklumat praklinikal yang berguna untuk meramal kesan farmakologi dadah sedia ada jika melibatkan kehadiran bersama sebatian-sebatian ketum ini.

**b. Dok molekul MTG dan 7-OH-MTG dengan AAG**

Kaedah dok molekul secara rawak juga telah digunakan bagi menentukan tapak pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada AAG varian F1\*S dan A dengan 1000 output. Hasil analisis kluster mendedahkan sejumlah 218 kluster konformer tunggal dan 135 kluster multi-konformer. Analisis dok molekul kedua-dua sebatian psikotropik pada AAG varian F1\*S menunjukkan pengikatan yang lebih stabil antara MTG dan protein berbanding dengan 7-OH-MTG (Rajah 4.18A). Kluster konformasi dengan tenaga pengikatan terendah bagi kompleks MTG-AAG varian F1\*S ( $-10.80 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) tidak hanya lebih stabil secara termodinamik berbanding 7-OH-MTG ( $-9.95 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), tetapi juga mempunyai kluster dengan populasi tertinggi sebanyak 48 jumlah konformer. Sementara itu, terdapat sebanyak 223 kluster konformer tunggal dan 128 kluster multi-konformer hasil daripada pengedokan MTG pada AAG varian A (Rajah 4.18B). Pola taburan kluster tersebut menunjukkan bahawa tenaga pengikatan kluster dok MTG yang paling stabil ( $-10.18 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) tidak berbeza secara signifikan berbanding kluster yang serupa bagi 7-OH-MTG ( $-10.44 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Walau bagaimanapun, populasi kedua-dua kluster ini adalah jauh lebih rendah berbanding dengan bilangan konformer bagi kluster dengan populasi paling tinggi untuk kedua-dua sebatian.



Rajah 4.18 Analisis kluster dok molekul MTG dan 7-OH-MTG dengan AAG varian (A) F1\*S dan (B) A. Hasil diperoleh daripada dok secara rawak dengan 1000 output bagi kedua-dua varian AAG. Analisis ini difokuskan sepenuhnya pada kluster multi-konformer sahaja.

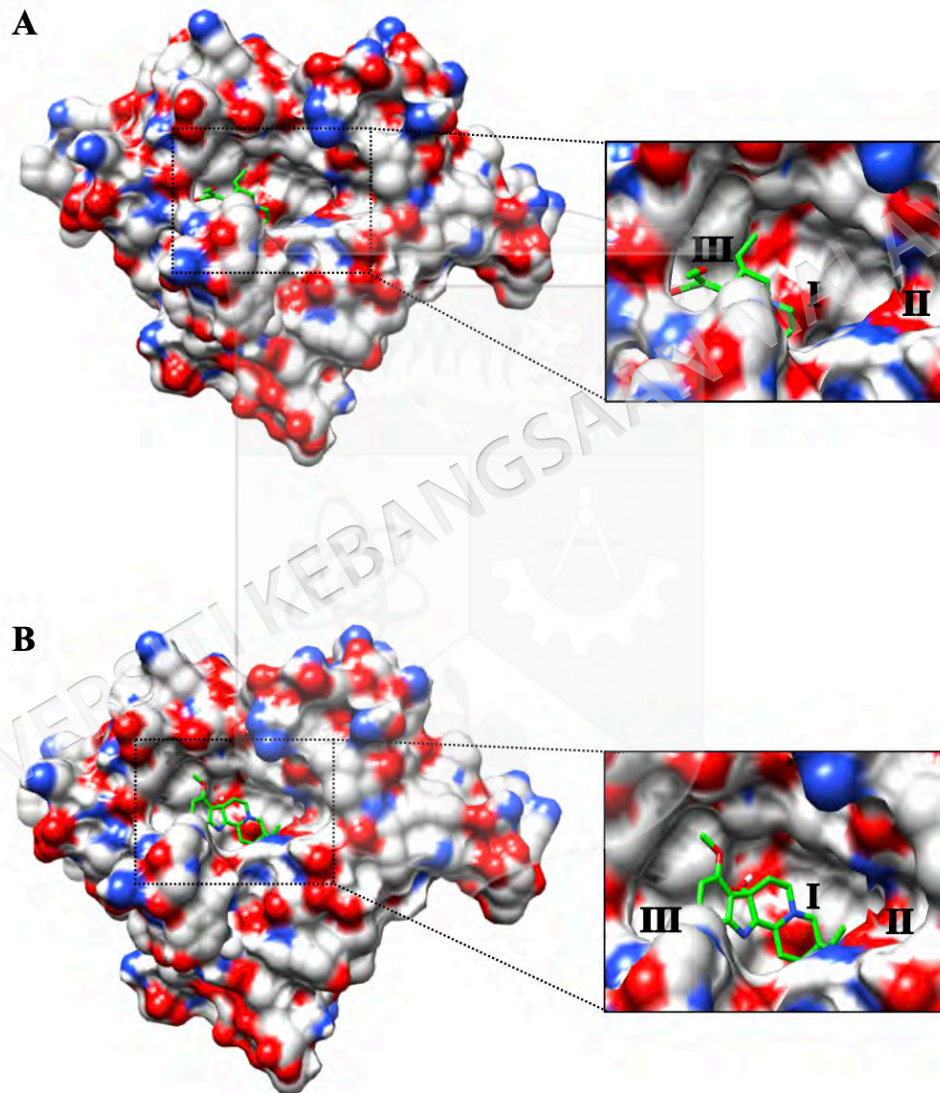
Saku pengikatan AAG varian F1\*S adalah agak besar kerana terdiri daripada tiga lobus (I–III). Lobus I adalah sub-kompartmen utama yang tak berkutub bagi saku pengikatan ini dan ia menyediakan ruang bagi pengikatan dadah hidrofobik. Manakala,

lobus II dan lobus III adalah kecil, bercas negatif dan berasid disebabkan oleh kehadiran residu asid amino berasid (Glu-64 di lobus II dan Asp-115 di lobus III) (Schönfeld et al. 2008; Zsila 2023). Sebaliknya, saku pengikatan ligan yang lebih sempit bagi varian A hanya mempunyai dua lobus, iaitu lobus hidrofobik yang berpusat pada tengah protein (lobus I) dan lobus II dengan struktur yang lebih kecil (Huang et al. 2012; Zsila 2023). Ciri-ciri saku pengikatan AAG yang besar dan versatil membenarkan pelbagai dadah mengikat pada masa yang sama (Owczarzy et al. 2023). Kajian lepas menunjukkan interaksi beberapa sebatian farmakologi dengan AAG melibatkan pertindihan lobus di dalam saku pengikatan, tanpa mengira varian (AlAjmi et al. 2020; Huang et al. 2012).

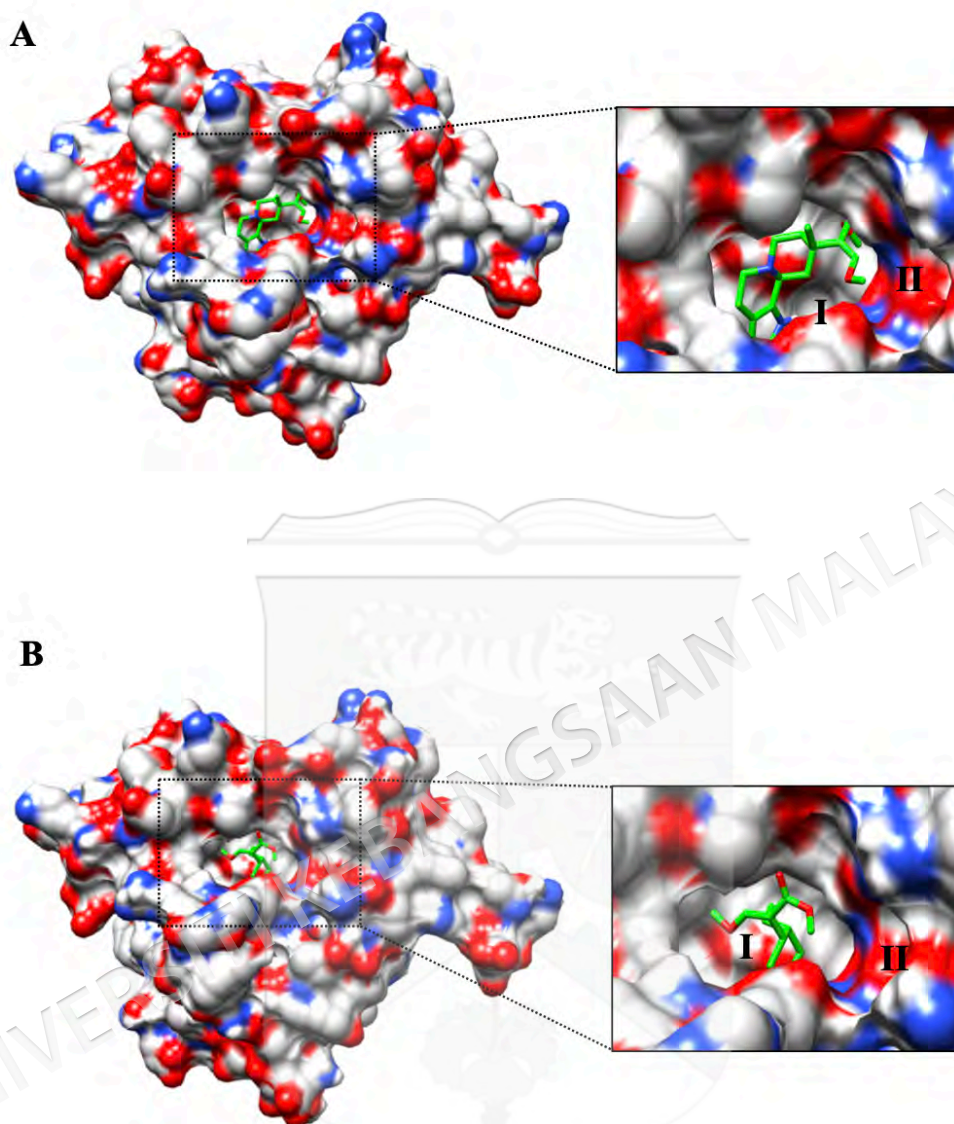
Rajah 4.19A dan Rajah 4.19B menggambarkan visualisasi konformasi paling stabil bagi MTG dan 7-OH-MTG pada varian F1\*S AAG. MTG dan 7-OH-MTG terikat pada saku pengikatan di tengah protein, dengan tenaga pengikatan sebanyak  $-10.80 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  dan  $-9.95 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , masing-masing. Analisis pengedokan menunjukkan bahawa MTG mengedok berdekatan dengan lobus III, sementara 7-OH-MTG mengikat berhampiran dengan lobus I, dan pada masa yang sama, sebahagian strukturnya terunjur ke dalam lobus III. Seperti pengikatan pada AAG varian F1\*S, kedua-dua MTG dan 7-OH-MTG juga didapati mengedok dalam saku pengikatan tengah protein AAG varian A, dengan tenaga pengikatan masing-masing sebanyak  $-10.18 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Rajah 4.20A) dan  $-10.44 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Rajah 4.20B). Walau bagaimanapun, terdapat perbezaan yang ketara dalam orientasi mereka, di mana 7-OH-MTG (Rajah 4.20B) lebih terbenam di dalam saku tersebut berbanding MTG (Rajah 4.20A).

Perbezaan mod pengikatan ligan terhadap varian F1\*S dan A boleh dikaitkan dengan perbezaan komposisi asid amino kedua-duanya. Perbezaan sebanyak 20 daripada 183 jumlah residu antara varian F1\*S dan A menghasilkan struktur topologi dan selektiviti pengikatan ubat yang unik (Nishi et al. 2011; Schönfeld et al. 2008). Sebagai contoh, dipiridamol, imatinib, warfarin, kuinidin dan mifepriston menunjukkan kecenderungan untuk mengikat kepada varian F1\*S, manakala sebatian trisiklik dengan dua cincin benzena (disopiramida, imipramina, amitriptilina, metadon dan deramsiklana) lebih cenderung mengikat kepada varian A (Huang & Ung 2013; Luo et al. 2015). Walaupun protein AAG

mempunyai lebih daripada tujuh tapak pengikatan berpotensi, namun hanya saku pengikatan di tengah protein mempunyai kepentingan terapeutik (Israili & Dayton 2001). Tapak ini juga menunjukkan afiniti yang tinggi terhadap pelbagai dadah seperti fedratinib (Jiang et al. 2024), ocalcitinib (Liu et al. 2024), dacomitinib (Hu et al. 2024), ibrutinib (Jiang et al. 2023), ceritinib (Wang et al. 2020a) dan brigatinib (Wang et al. 2020b).



Rajah 4.19 Model molekul mengedok (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG pada AAG varian F1\*S (ID PDB: 3KQ0) yang menunjukkan orientasi pengikatan bagi konformasi ligan yang paling stabil (hijau) dengan tenaga mengedok terkuat.



Rajah 4.20 Model molekul mengedok (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG pada AAG varian A (ID PDB: 3APU) yang menunjukkan orientasi pengikatan bagi konformasi ligan yang paling stabil (hijau) dengan tenaga mengedok terkuat.

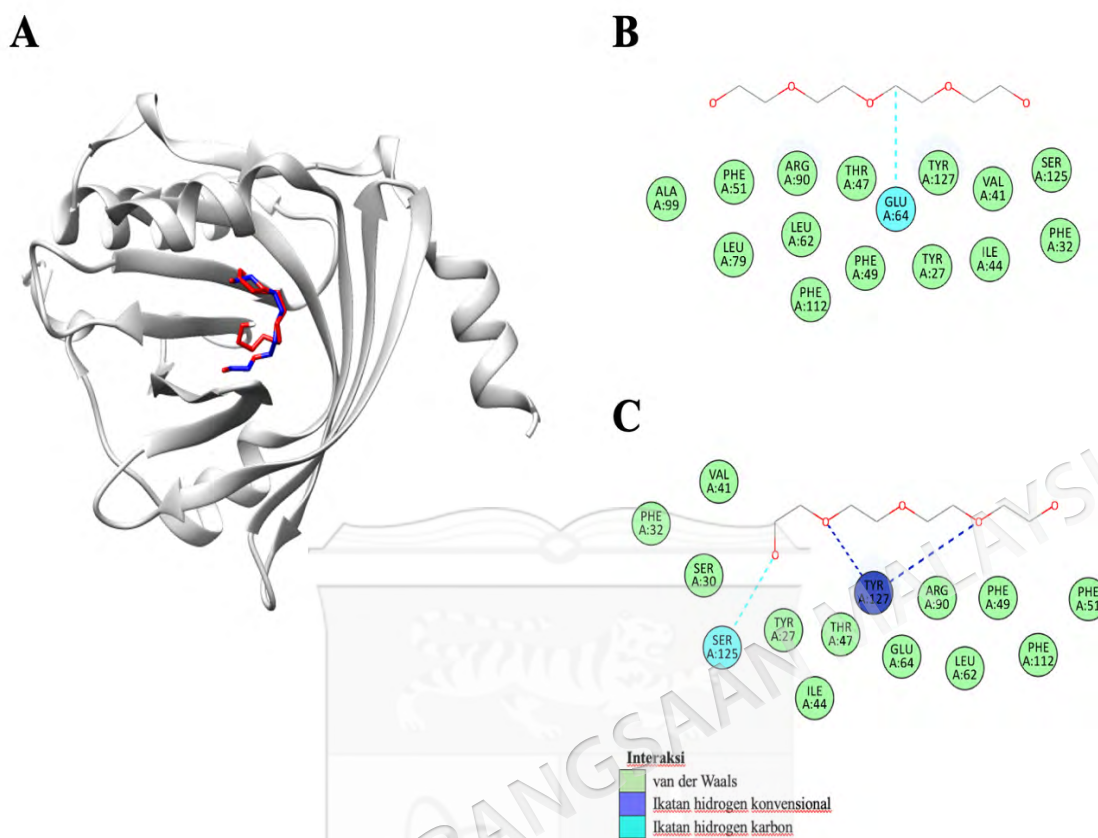
Kesimpulannya, hasil kajian menunjukkan bahawa pengikatan MTG dan 7-OH-MTG adalah pada subdomain IB atau tapak pengikatan III. Namun, interaksinya dengan AAG menunjukkan bahawa kedua-dua sebatian cenderung mengikat pada tengah protein pada kedua-dua varian AAG.

### c. Pengesahsahihan prosedur simulasi dok molekul

Pengedokan semula merupakan kaedah yang digunakan untuk menilai ketepatan prosedur simulasi dok molekul dengan membandingkan orientasi ligan yang didokkan semula dengan orientasi asalnya dalam struktur kristalografi (Gholam et al. 2022; Mkhayar et al. 2023). Oleh itu, kaedah ini telah dijalankan menggunakan ligan tetraetilena glikol ( $C_8H_{18}O_5$ ) yang asalnya dikristalkan pada protein menggunakan struktur AAG varian A (PDB ID: 3APU) sebagai model untuk mengesahkan prosedur dok molekul yang digunakan dalam kajian ini.

Hasil perbandingan orientasi ligan tetraetilena glikol yang dikristalkan dengan orientasinya setelah didokkan semula pada protein telah digambarkan dalam Rajah 4.21A. Seperti yang dapat dilihat, ligan yang didokkan semula mengikat pada protein di lokasi yang sama seperti ligan yang dikristalkan. Selain itu, RMSD ligan di antara dua orientasi tersebut adalah 1.885 Å, menunjukkan kesamaan yang tinggi antara struktur-struktur tersebut (Gholam et al. 2022). Nilai RMSD merupakan parameter utama yang digunakan untuk menilai ketepatan prosedur pengedokan semula, di mana nilai RMSD  $<2$  Å menunjukkan ketepatan tinggi, 2-3 Å dianggap boleh diterima, manakala  $>3$  Å menunjukkan ketidaktepatan dan memerlukan pelarasan parameter pengedokan (Ramírez & Caballero 2018). Tambahan pula, interaksi ikatan hidrogen dan van der Waals memainkan peranan penting dalam kestabilan kompleks kedua-dua struktur ini. Residu asid amino yang berinteraksi dengan kedua-dua struktur ligan tersebut telah dikenal pasti dan mendapati hampir serupa iaitu Phe-51, Arg-90, Leu-62, Phe-112, Thr-47, Phe-49, Glu-64, Tyr-27, Tyr-127, Ile-44, Val-41, Ser-125 dan Phe-32 (Rajah 4.21B dan Rajah 4.21C), yang sekaligus mengesahkan keutuhan protokol simulasi dok molekul ini.

Kesimpulannya, hasil pengedokan semula yang dijalankan menunjukkan ketepatan yang tinggi berdasarkan nilai RMSD yang diperoleh ( $<2$  Å) dan persamaan residu asid amino yang berinteraksi dengan ligan pada kristal asal protein. Maka, pengesahsahihan dalam kajian ini memastikan hasil simulasi dok molekul adalah boleh dipercayai untuk kajian interaksi ligan-reseptor.



Rajah 4.21 Perbandingan antara orientasi ligan tetraetilena glikol yang dikristalkan (biru) dan yang didokkan semula (merah) dengan AAG varian A (PDB ID: 3APU). Interaksi residu asid amino dengan ligan yang (B) dikristalkan dan (C) didokkan semula.

#### 4.5 PENGLIBATAN DAYA INTERMOLEKUL DALAM PENGKOMPLEKSAN PROTEIN-LIGAN

Pengikatan protein–ligan kebiasaannya melibatkan daya bukan kovalen seperti ikatan hidrogen, daya van der Waals, interaksi ionik dan interaksi hidrofobik. Afiniti pengikatan ini adalah berkaitan dengan jenis daya intermolekul yang terlibat, yang dipengaruhi oleh geometri molekul berkaitan susunan atom, jarak antara molekul dan sifat elektronik spesies yang berinteraksi. Maka, analisis struktur sebatian MTG dan 7-OH-MTG menggunakan perisian Chemicalize (ChemAxon Discovery Toolkit) dan analisis lanjutan output dok

molekul melalui perisian Biovia Discovery Studio telah dilakukan untuk mengenalpasti jenis-jenis daya intermolekul yang terlibat dalam pengkompleksan protein–ligan.

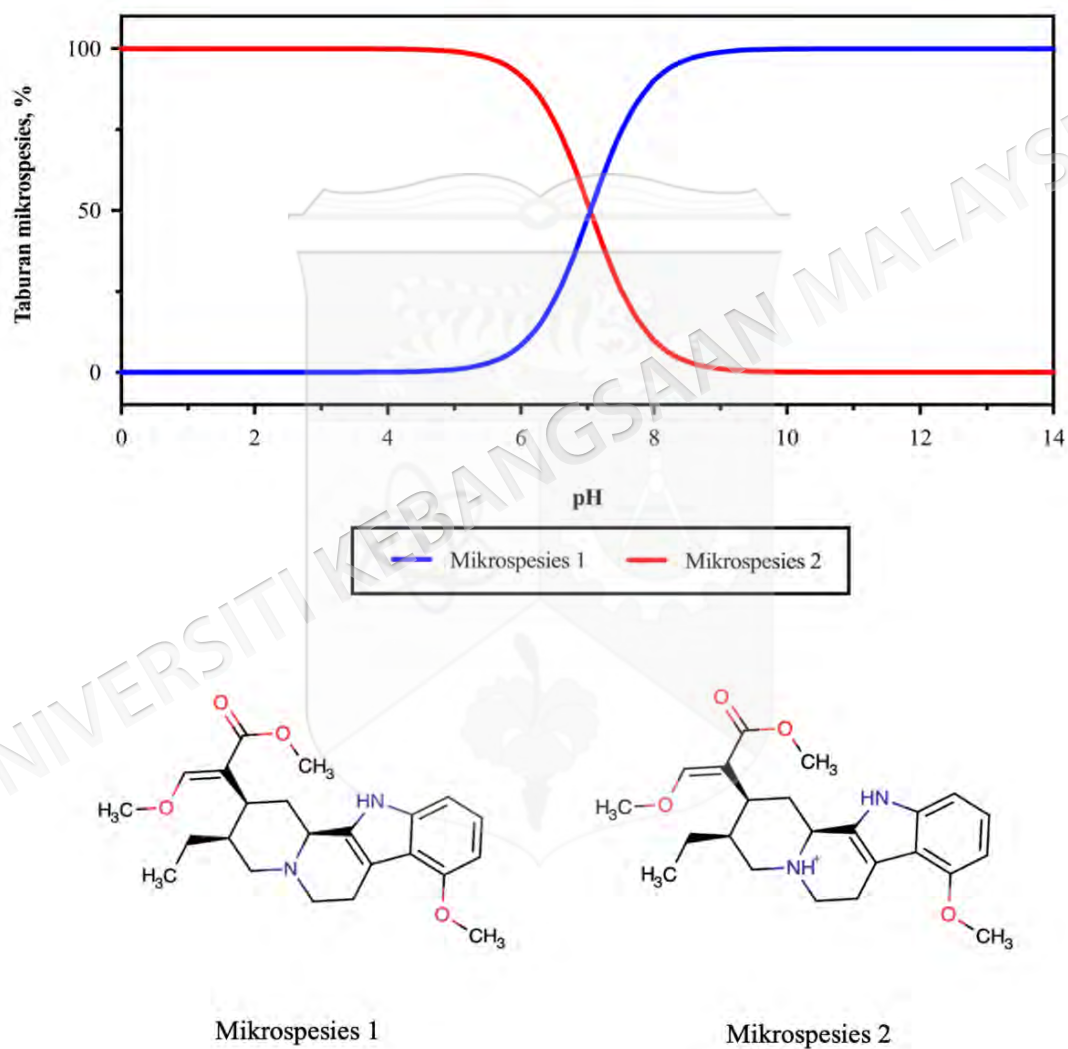
#### 4.5.1 Analisis struktur molekul MTG dan 7-OH-MTG menggunakan perisian Chemicalize

Perisian Chemicalize (Chemaxon Discovery Toolkit) membekalkan maklumat parameter fisiko-kimia sesuatu sebatian ligan termasuklah  $\log P$ ,  $pK_a$ , kebolehlarutan, luas permukaan berketub topologi (TPSA), luas permukaan van der Waals serta bilangan penderma dan penerima ikatan hidrogen. Maklumat ini boleh dimanfaatkan untuk meramalkan interaksi yang berkemungkinan berlaku apabila MTG dan 7-OH-MTG berinteraksi dengan kedua-dua, HSA dan AAG.

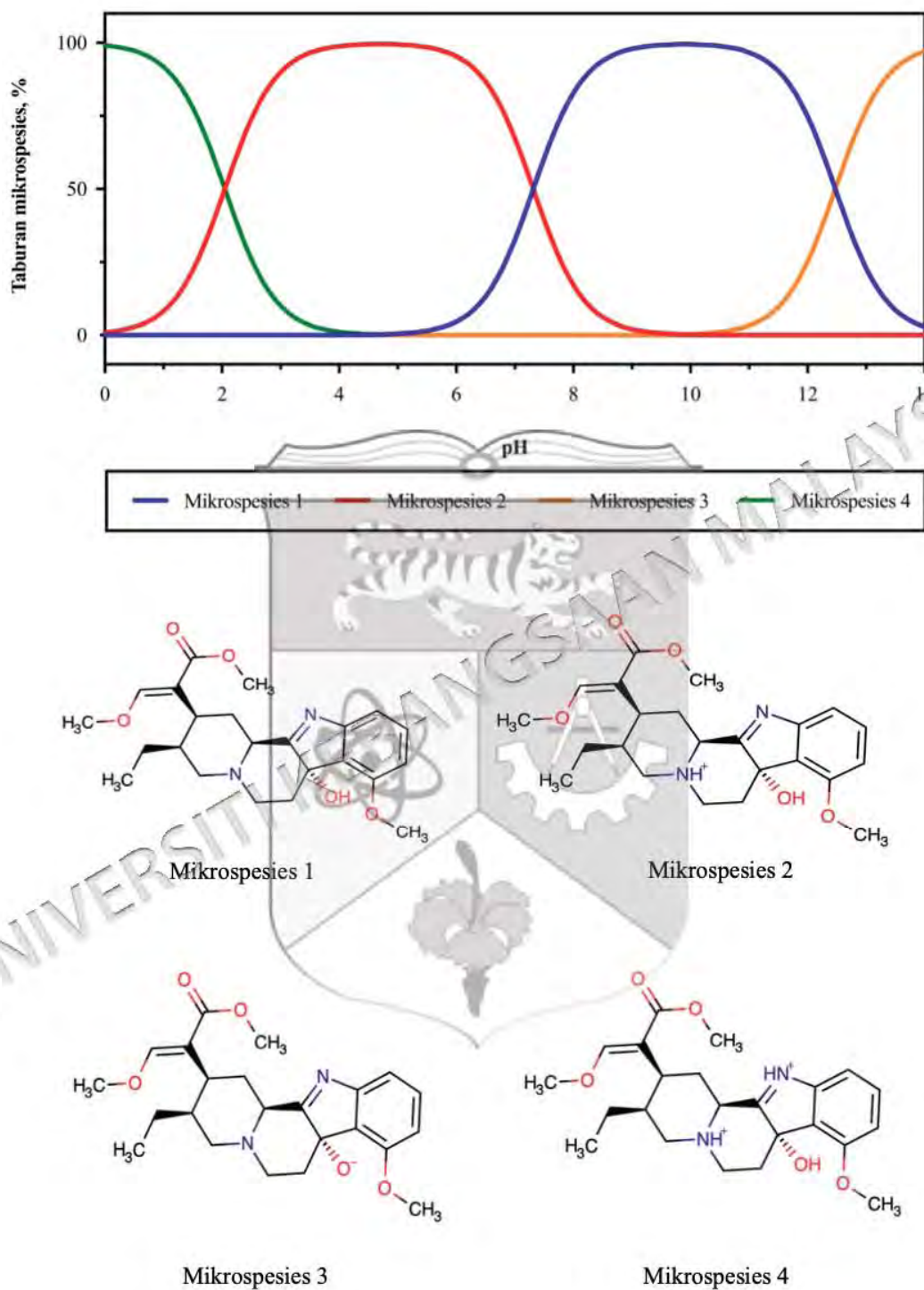
Perincian mengenai distribusi cas dan kecenderungan pengionan atau penyahionan sesuatu molekul dalam persekitaran tertentu boleh digunakan untuk meramalkan interaksi ionik. Interaksi ionik adalah daya intermolekul yang disebabkan oleh tarikan elektrostatik di antara dua kumpulan cas berlawanan dan adalah lebih kuat berbanding daya van der Waals (Mantri, Sanghvi & Zhu 2017). Pembentukan interaksi ini melibatkan kumpulan bercas positif seperti ion  $\alpha$ -ammonium,  $\epsilon$ -ammonium, guanidinium dan imidazolium; serta kumpulan bercas negatif seperti ion  $\alpha$ -karboksil, kumpulan  $\beta$ -karboksil,  $\gamma$ -karboksil, fosfat, dan sulfat (Bhagavan & Ha 2015). Berdasarkan analisis struktur, populasi molekul MTG yang tidak bercas (mikrospecies 1) adalah sebanyak 69.5%, manakala yang bercas (mikrospecies 2) adalah sebanyak 30.5% pada pH fisiologi, 7.4 (Rajah 4.22). Bagi 7-OH-MTG pula, taburan molekul tidak bercas (mikrospecies 1) adalah sebanyak 54.8%, manakala taburan molekul yang bercas (mikrospecies 2) adalah sebanyak 45.2% pada pH fisiologi (Rajah 4.23). Molekul 7-OH-MTG bercas yang lain, iaitu mikrospecies 3 dan mikrospecies 4 yang ternyata tidak wujud pada pH 7.4.

Tambahan lagi, berdasarkan lengkung cas melawan pH pada Rajah 4.24, didapati MTG mempunyai cas sebanyak 0.30, manakala 7-OH-MTG mempunyai cas lebih tinggi iaitu sebanyak 0.45 pada pH fisiologi. Ini menunjukkan bahawa pada pH fisiologi, molekul 7-OH-MTG adalah lebih ionik berbanding molekul MTG. Namun, hasil ini hanya menjangkakan interaksi ionik yang lemah dalam pengikatan sebatian-sebatian ini dengan

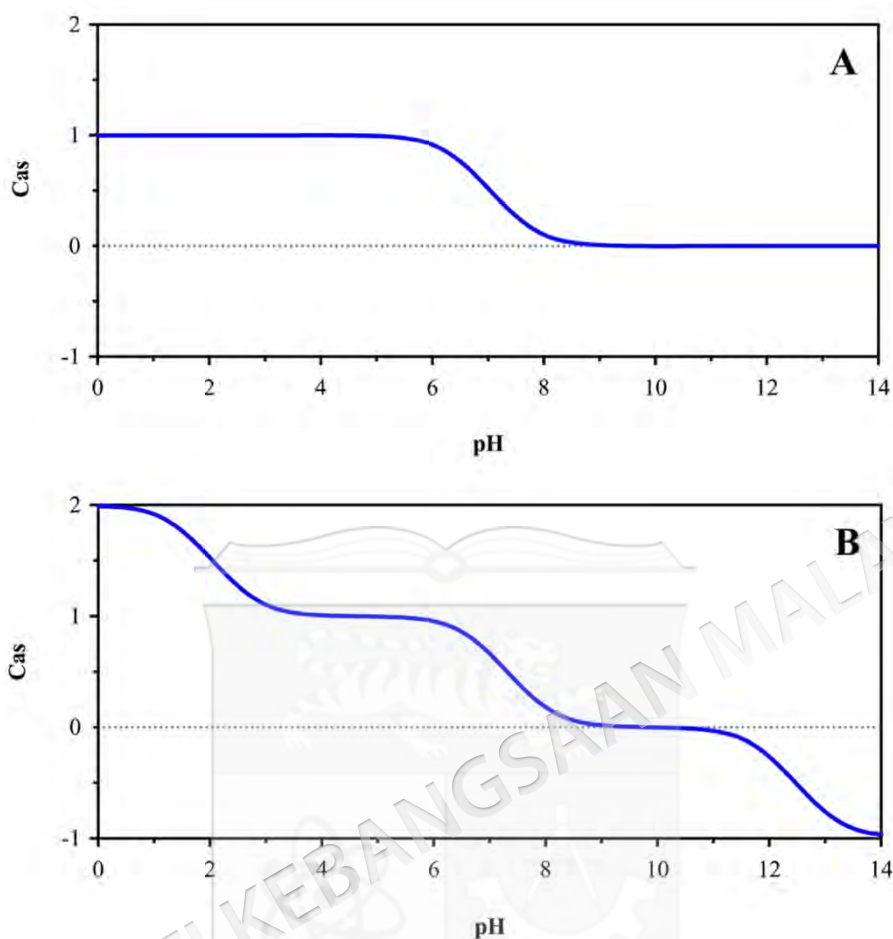
protein plasma. Oleh demikian, walaupun sebahagian besar populasi kedua-dua molekul ini berada dalam keadaan neutral pada pH fisiologi, namun terdapat kemungkinan wujudnya interaksi ionik antara MTG dan 7-OH-MTG dengan residu bercas negatif seperti asid aspartik dan asid glutamik dalam HSA dan AAG.



Rajah 4.22 Taburan dua mikrospecies MTG yang hadir pada skala pH 0–14.



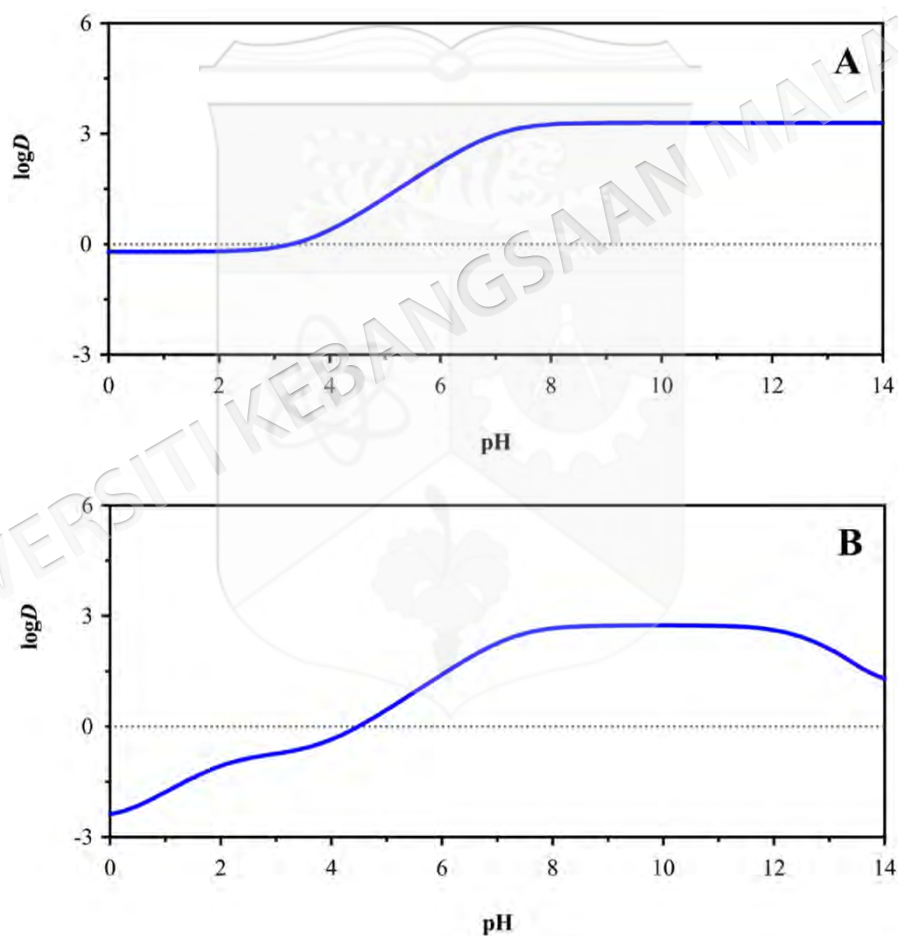
Rajah 4.23 Taburan empat mikrospecies 7-OH-MTG yang hadir pada skala pH 0–14



Rajah 4.24 Lengkuh cas melawan pH bagi molekul MTG dan 7-OH-MTG. (A) Molekul MTG mempunyai cas positif pada julat pH 0–9.3 dan tiada cas pada julat pH 9.4–14. (B) Molekul 7-OH-MTG mempunyai cas positif pada julat pH 0–9.5, tiada cas pada pH 9.6–10.2 dan cas negatif pada pH 10.3–14.

Seterusnya, kewujudan interaksi hidrofobik boleh diramalkan berdasarkan karakteristik lipofilik sesuatu sebatian melalui pekali taburan ( $\log D$ ) dan pekali partisi ( $\log P$ ). Interaksi hidrofobik adalah suatu bentuk daya lemah yang menerangkan kecenderungan kumpulan tidak berkutub yang mempunyai keterlarutan air rendah untuk berasosiasi sesama sendiri dalam larutan akues (Bogunia & Makowski 2020). Pekali  $\log D$  digunakan untuk mengukur nisbah kepekatan sebatian ternyahion kepada terion pada pH tertentu, sesuai untuk sebatian lipofilik terion dan bergantung kepada pH (Bhal et al. 2007; Gaohua, Miao & Dou 2021). Manakala,  $\log P$  digunakan untuk mengukur nisbah kepekatan

molekul dalam larutan oktanol kepada larutan air pada keadaan ekulibrium, sesuai bagi sebatian lipofilik tak terion dan tidak bergantung pada pH (Bhal et al. 2007; Gaohua, Miao & Dou 2021). Maka, penentuan nilai  $\log D$  digunakan untuk menilai sifat keterlarutan MTG dan 7-OH-MTG dalam pelbagai pelarut organik dan air. Hasil pada Rajah 4.25 menunjukkan nilai  $\log D$  pada pH fisiologi 7.4 yang diperoleh bagi MTG adalah lebih tinggi (3.14) berbanding 7-OH-MTG (2.49). Nilai  $\log D$  lebih dari 0 ini menerangkan sebatian lipofilik dengan keterlarutan akues yang rendah (Lapins et al. 2018), dan berkemungkinan mengikat pada protein plasma melalui interaksi hidrofobik secara ketara.



Rajah 4.25 Lengkok  $\log D$  bagi molekul MTG dan 7-OH-MTG melawan pH. Nilai  $\log D$  tertinggi bagi molekul MTG adalah 3.30 pada julat pH 9.1–14, manakala bagi molekul 7-OH-MTG adalah 2.75 pada julat pH 9.5–10.3.

Selanjutnya, jangkauan ikatan hidrogen boleh dilakukan berdasarkan kehadiran penderma dan penerima ikatan hidrogen dalam struktur sesuatu sebatian. Ikatan hidrogen merupakan sejenis interaksi dwikutub yang terhasil daripada daya tarikan antara atom hidrogen yang terikat secara kovalen kepada atom elektronegatif seperti F, O atau N, dengan atom berhampiran yang juga elektronegatif (Bulusu & Desiraju 2020; Mantri, Sanghvi & Zhu 2017). Kekuatan interaksi ini bergantung kepada panjang ikatan hidrogen, dengan panjang ikatan dalam julat 2.2–2.5 Å dikategorikan sebagai kuat, 2.5–3.2 Å sebagai sederhana dan 3.2–4.0 Å sebagai lemah (Ferrell & Jackson 1999). Keelektronegatifan penerima ikatan hidrogen juga mempengaruhi kekuatan sesuatu ikatan hidrogen dengan urutan  $F > O > N$  (Bulusu & Desiraju 2020; Mantri, Sanghvi & Zhu 2017). Ikatan hidrogen memainkan peranan penting dalam kestabilan kompleks protein–ligan. Di dalam kajian ini, analisis struktur molekul MTG dan 7-OH-MTG menunjukkan bahawa kedua-duanya mempunyai satu penderma ikatan hidrogen, manakala bilangan penerima ikatan hidrogen bagi MTG adalah empat dan bagi 7-OH-MTG adalah enam. Justeru itu, pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG dengan protein plasma juga berkemungkinan melibatkan ikatan hidrogen yang disumbangkan oleh penerima dan penderma ikatan hidrogen ini.

Jangkauan pembentukan ikatan hidrogen juga boleh dilakukan berdasarkan nilai TPSA. TPSA adalah ukuran keluasan permukaan sesuatu molekul yang disumbangkan oleh heteroatom (F, O, N) serta atom hidrogen yang berkutub (Prasanna & Doerksen 2009). Ia sering digunakan dalam menilai kemampuan sesuatu molekul untuk meresap ke dalam sel seperti penyerapan usus (nilai TPSA kurang 140 Å<sup>2</sup>) dan penelapan rintangan darah otak (nilai TPSA kurang 60 Å<sup>2</sup>) (Mammadova, Mermer & Kocabas 2021). Ia juga menjadi petunjuk tentang sifat hidrofilik dan kebolehan sesuatu molekul untuk membentuk ikatan hidrogen dalam sistem biologi. Di dalam kajian ini, nilai TPSA bagi MTG adalah sebanyak 63.79 Å<sup>2</sup>, mencadangkan luas permukaan berkutub yang sederhana (julat TPSA sederhana : 20–70 Å<sup>2</sup>), yang membolehkan interaksi dengan persekitaran yang bersifat hidrofobik dan hidrofilik. Dengan nilai TPSA sebanyak 80.95 Å<sup>2</sup>, 7-OH-MTG mempunyai keluasan permukaan berkutub yang lebih besar berbanding MTG. 7-OH-MTG mempunyai nilai TPSA yang tinggi (<70 Å<sup>2</sup>) dan mempunyai keupayaan lebih besar berbanding MTG untuk membentuk ikatan hidrogen dan berinteraksi dengan persekitaran berkutub.

Selanjutnya, keterlibatan daya van der Waals dapat dijangkakan berdasarkan luas permukaan van der Waals yang mengukur permukaan yang boleh diakses oleh suatu molekul berdasarkan jejari van der Waals (Bajusz, Rácz & Héberger 2017). Daya van der Waals merupakan daya elektrostatik lemah yang menarik molekul neutral antara satu sama lain. Analisis mendapati nilai luas permukaan van der Waals bagi 7-OH-MTG adalah  $385.83 \text{ \AA}^2$ , yang lebih luas sedikit berbanding dengan MTG ( $376.42 \text{ \AA}^2$ ). Perbezaan ini mungkin disebabkan oleh kehadiran kumpulan hidroksil pada struktur 7-OH-MTG, yang menyebabkan interaksi antara molekul dengan persekitarannya dan keterlarutan dalam pelarut yang berbeza. Namun begitu, kekuatan dan kespesifikan interaksi ini boleh dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kehadiran kumpulan berkutub atau bercas, orientasi molekul dan jarak di antara protein dan ligan.

Secara keseluruhannya, ramalan daya intermolekul yang berkemungkinan berlaku antara MTG dan 7-OH-MTG daripada ketum dengan protein plasma berdasarkan analisis struktur ini, adalah jangkaan awal yang memerlukan data tambahan sebagai pengesahan. Maka, output yang diperoleh daripada simulasi dok molekul sebelum ini telah dianalisis secara lanjut untuk mengenalpasti daya intermolekul yang mungkin terlibat dalam menstabilkan kompleks protein–ligan.

#### **4.5.2 Analisis output simulasi dok molekul menggunakan perisian Biovia Discovery Studio**

Pengenalpastian daya intermolekul yang terlibat dalam pengkompleksan protein–ligan juga boleh dilakukan melalui output simulasi dok molekul menggunakan perisian Biovia Discovery Studio. Perisian ini menyertakan alat analisis medan daya yang membenarkan pengguna menganalisis pelbagai jenis daya intermolekul, antaranya, daya van der Waals, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi halogen dan juga interaksi penderma-penderma tak sesuai (*unfavourable*).

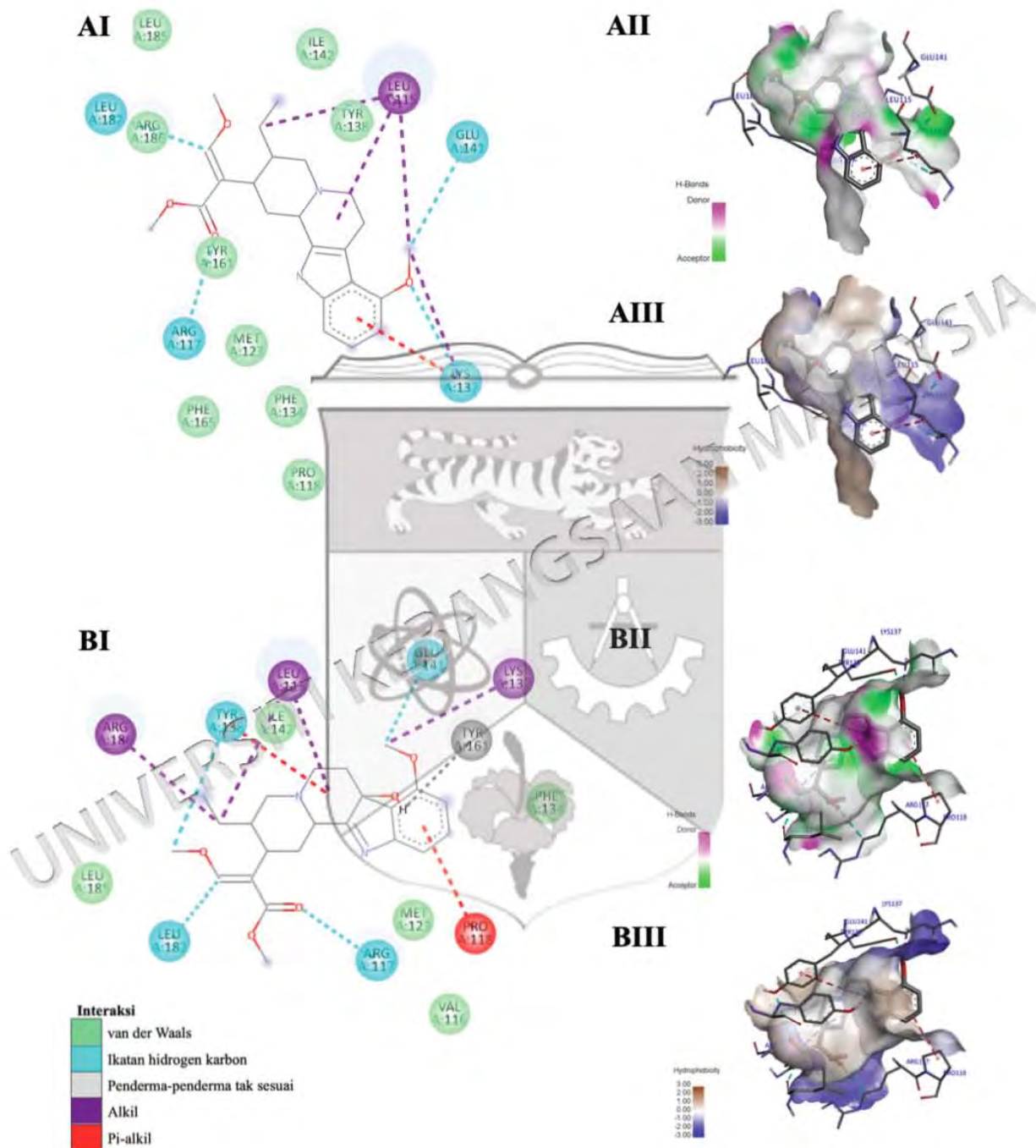
##### **a. Daya intermolekul dalam pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG dengan HSA**

Daya intermolekul yang terlibat dalam pengkompleksan MTG–HSA dan 7-OH-MTG–HSA di subdomain IB (tapak pengikatan III) adalah ditunjukkan dalam Rajah 4.26, manakala

ringkasan maklumat mengenai jenis-jenis interaksi, residu asid amino yang terlibat dan jarak ikatan intermolekul adalah disenaraikan dengan terperinci di dalam Jadual 4.8.

Penglibatan empat ikatan hidrogen karbon telah dikenalpasti dalam pengkompleksan MTG–HSA dan 7-OH-MTG–HSA. Tiga ikatan hidrogen karbon ini diperantara oleh residu asid amino yang sama (Leu-182, Arg-117 dan Glu-141) dan satu residu asid amino yang berbeza, iaitu Lys-137 dengan jarak interatomik = 2.97 Å bagi kompleks MTG–HSA (Rajah 4.26AI) dan Tyr-138 dengan jarak interatomik = 3.59 Å bagi kompleks 7-OH-MTG–HSA (Rajah 4.26BI). Kawasan-kawasan bagi residu-residu asid amino HSA yang bertindak sebagai penderma hidrogen (diwakili oleh warna merah jambu) dan penerima hidrogen (diwakili oleh warna hijau) bagi ikatan hidrogen adalah ditunjukkan dalam Rajah 4.26AII dan Rajah 4.26BII. Residu-residu asid amino ini memainkan peranan penting dalam menstabilkan kompleks melalui pembentukan ikatan hidrogen yang spesifik dengan mengekalkan posisi ligan dalam tapak pengikatan protein.

Selain itu, MTG dan 7-OH-MTG juga mengikat kuat melalui interaksi hidrofobik (alkil dan pi-alkil) dan daya van der Waals. Permukaan hidrofobik bagi kawasan sekitar MTG (Rajah 4.26AIII) dan 7-OH-MTG (Rajah 4.26BIII) telah digambarkan, dengan kawasan hidrofilik diwakili warna biru (skor negatif) dan kawasan hidrofobik warna perang (skor positif). Daya van der Waals adalah lebih ketara dalam kompleks HSA dengan MTG berbanding dengan 7-OH-MTG, disebabkan kuantiti asid amino terlibat yang lebih tinggi (Leu-185, Ile-142, Tyr-138, Arg-186, Tyr-161, Met-123, Phe-165, Phe-134, Pro-118). Ini menjelaskan bahawa pengedokan MTG adalah lebih stabil daripada 7-OH-MTG pada HSA kerana dianggap mempunyai persekitaran kohesi yang kuat. Sebaliknya, interaksi tidak sesuai terhasil daripada penderma hidrogen yang melibatkan residu Tyr-161 kepada penderma hidrogen lain (kumpulan hidroksil bagi 7-OH-MTG) yang mempamerkan ketidakstabilan disebabkan oleh daya tolakan (Gholam et al. 2022). Hasil ini adalah selari dengan analisis dok molekul yang mempamerkan pengikatan MTG adalah stabil berbanding 7-OH-MTG.



Rajah 4.26 Gambar rajah skematik bagi interaksi residu asam amino HSA dengan (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG. (I) Daya intermolekul dan residu asam amino yang terlibat, (II) permukaan ikatan hidrogen dan (III) permukaan hidrofobik pada tapak pengikatan HSA.

Jadual 4.8 Jenis-jenis interaksi, residu asid amino yang terlibat dan jarak intermolekul dalam pengkompleksan HSA dengan MTG dan 7-OH-MTG

Kompleks	Kategori ikatan	Jenis ikatan	Tempat interaksi	Jarak (Å)		
HSA+MTG	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrogen karbon	LIG1:C - A:GLU141:OE2	3.68		
			A:ARG117:CD - :LIG1:O	3.07		
			LIG1:C - A:LEU182:O	3.06		
			A:LYS137:HE1 - : LIG1:O	2.97		
	Interaksi hidrofobik	Pi-alkil	LIG 1 -A:LYS137	5.10		
			Alkil	LIG1:C - A:LYS137	4.56	
				LIG1:C - A:LEU115	4.71	
				LIG1:C - A:LEU115	4.72	
				A:LEU115 - : LIG1	4.80	
				HSA +	Tidak sesuai	Penderma-penderma tak sesuai
7-OH-MTG	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrogen karbon	LIG2:C - A:TYR138:OH			
			LIG2:C - A:LEU182:O	2.76		
			A:ARG117:CD - : LIG2:O	3.18		
			LIG2:C - A:GLU141:OE2	3.06		
			Interaksi hidrofobik	Pi-alkil	LIG2 - A:PRO118	5.12
					A:TYR138 - : LIG2	5.28
			Interaksi hidrofobik	Alkil	LIG2:C - A:LYS137	3.46
LIG2:C - A:LEU115	5.15					
LIG2:C - A:ARG186	4.61					
A:LEU115 - : LIG2	4.65					

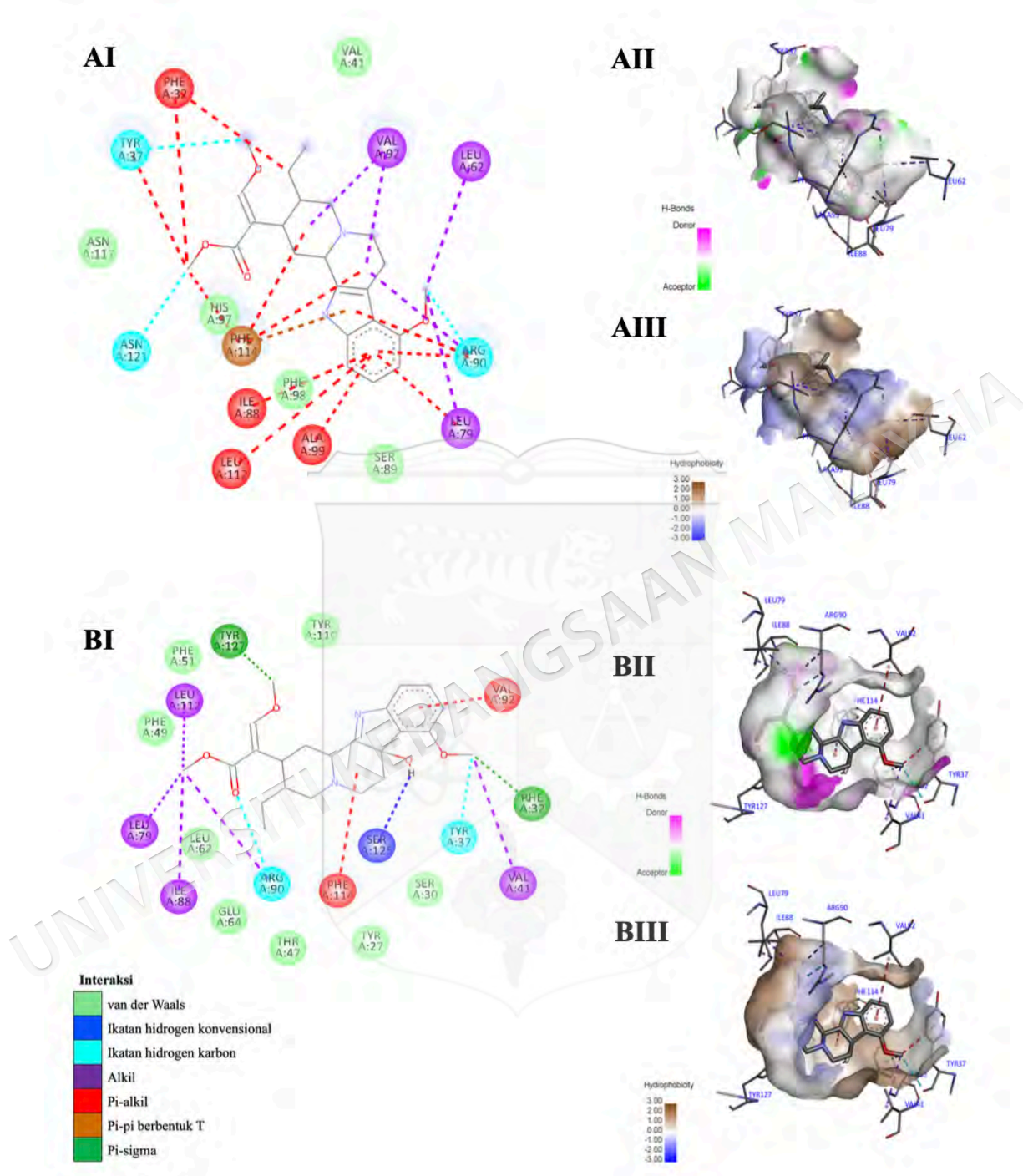
\*LIG1=MTG, LIG2=7-OH-MTG

**b. Daya intermolekul dalam pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG dengan AAG varian F1\*S**

Daya intermolekul yang memainkan peranan penting dalam pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada saku pengikatan tengah protein AAG varian F1\*S juga telah dikenalpasti seperti di dalam Rajah 4.27 dengan butiran terperinci disenaraikan dalam Jadual 4.9.

Pada AAG varian F1\*S, MTG mengikat kuat pada tapak pengikatan tanpa melibatkan ikatan hidrogen konvensional (Rajah 4.27AI). Sebaliknya, kumpulan hidroksil pada 7-OH-MTG bertindak sebagai penderma ikatan hidrogen yang membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan Ser-125 (Rajah 4.27BI). Kawasan permukaan ikatan hidrogen di sekitar ligan ditunjukkan dalam Rajah 4.27AII dan Rajah 4.27BII. Kedua-dua ligan ini membentuk ikatan hidrogen karbon dengan protein melibatkan residu asid amino yang sama, iaitu Tyr-37 dan Arg-90. Perbezaan orientasi kedua-dua konfigurasi ligan pada protein ini boleh dikaitkan dengan penglibatan daya van der Waals (Rajah 4.27BI). Jumlah asid amino yang terlibat dalam pembentukan daya van der Waals adalah lebih banyak bagi kompleks 7-OH-MTG–AAG varian F1\*S (Tyr-110, Phe-51, Phe-49, Leu-62, Glu-64, Thr-47, Tyr-27 dan Ser-30) berbanding kompleks MTG–AAG varian F1\*S (Val-41, Asn-117, His-97, Phe-98 dan Ser-89).

Daya hidrofobik memainkan peranan utama dalam pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada AAG varian F1\*S. Namun, interaksi hidrofobik yang melibatkan interaksi sistem pi adalah lebih menonjol dalam interaksi MTG kepada protein ini (Rajah 4.27AI). Kompleks MTG–AAG varian F1\*S melibatkan interaksi pi-alkil dengan jumlah lebih besar dan interaksi penindanan pi “berbentuk T” melalui residu asid amino Phe-114. Penglibatan pi-pi “berbentuk T” yang melibatkan residu Phe-114 pada lobus III protein juga diperhatikan dalam beberapa kajian lepas (Jiang et al. 2024; Wang et al. 2020a; Wang et al. 2020b). Interaksi pi-sigma juga diperhatikan apabila 7-OH-MTG terikat kepada protein ini, yang diperantara oleh dua residu aromatik, iaitu Phe-32 dan Tyr-127. Pembentukan daya hidrofobik alkil bagi kedua-dua kompleks MTG–AAG varian F1\*S dan 7-OH-MTG–AAG varian F1\*S adalah pada jumlah yang sama. Permukaan hidrofobik yang disekeliling ligan adalah ditunjukkan dalam Rajah 4.27AIII dan Rajah 4.27BIII. Harus ditekankan bahawa



Rajah 4.27 Gambar rajah skematik bagi interaksi residu asid amino AAG varian F1\*S dengan (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG. (I) Daya intermolekul dan asid amino yang terlibat, (II) permukaan ikatan hidrogen dan (III) permukaan hidrofobik pada tapak pengikatan AAG varian F1\*S.

Jadual 4.9 Jenis-jenis interaksi, residu asid amino yang terlibat dan jarak intermolekul dalam pengkompleksan AAG varian F1\*S dengan MTG dan 7-OH-MTG

Kompleks	Kategori ikatan	Jenis ikatan	Tempat interaksi	Jarak (Å)	
AAG varian F1*S + MTG	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrogen karbon	LIG1:C - A:TYR37:OH	3.41	
			LIG1:C - A:ASN121:O	3.12	
			LIG1:C - A:ARG90:NH1	3.64	
	Interaksi hidrofobik	Pi-pi berbentuk T	Pi-alkil	LIG1 - A:PHE114	4.97
				A:TYR37 - : LIG1:C	4.77
		Alkil	LIG1 - A:LEU112	5.37	
			LIG1 - A:ILE88	5.25	
			LIG1 - A:ALA99	4.53	
			LIG1 - A:ARG90	3.96	
			LIG1 - A:ARG90	4.20	
			LIG1 - A:LEU79	5.35	
			A:PHE32 - : LIG1:C	5.46	
			A:PHE114 - : LIG1:C	5.33	
			A:PHE32 - : LIG1:C	4.35	
			A:PHE114 - : LIG1	5.45	
			A:PHE114 - : LIG1	5.37	
			A:VAL92 - : LIG1	3.90	
			LIG1:C - A:LEU62	4.98	
			LIG1:C - A:LEU79	4.26	
			A:VAL92 - : LIG1	5.48	
A:ARG90 - : LIG1	4.52				
AAG varian F1*S + 7-OH-MTG	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrogen konvensional	LIG2:H - A:SER125:OG	2.49	
			Ikatan hidrogen karbon	A:ARG90:CD - : LIG2:O	3.22
		LIG2:C - A:TYR37:O		3.53	
	Interaksi hidrofobik	Pi-sigma	LIG2:C - A:PHE32	3.81	
			LIG2:C - A:TYR127	3.41	
		Pi-alkil	A:PHE114 - : LIG2	5.37	
			A:TYR37 - : LIG2:C	4.70	
			LIG2 - A:VAL92	5.15	
		Alkil	LIG2:C - A:ARG90	4.42	
			LIG2:C - A:VAL41	4.39	
			LIG2:C - A:LEU79	4.39	
			LIG2:C - A:LEU112	5.23	
			LIG2:C - A:ILE88	4.40	

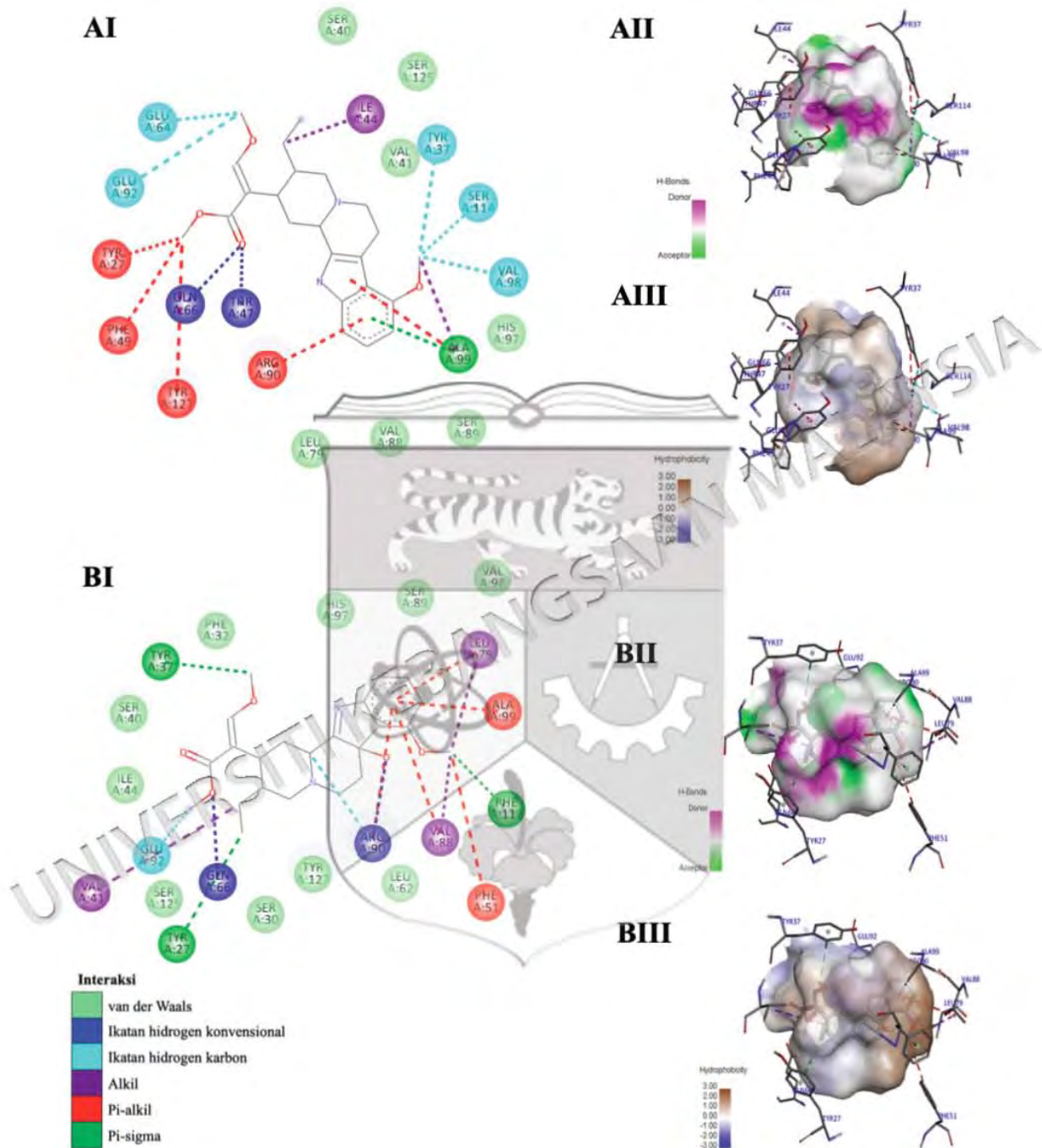
\*LIG1=MTG, LIG2=7-OH-MTG

struktur gegelang indol MTG telah membentuk sejumlah 12 interaksi berbeza dengan protein ini, berbanding hanya dua interaksi sebegini dalam kompleks 7-OH-MTG–AAG varian F1\*S. Penglibatan interaksi intermolekul yang banyak ini membolehkan MTG mengedok dengan lebih dalam pada saku pengikatan AAG varian F1\*S. Ini seterusnya menyumbang kepada kestabilannya yang lebih tinggi berbanding 7-OH-MTG dan menyokong hasil dok molekul sebelumnya.

**c. Daya intermolekul dalam pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG dengan AAG varian A**

Pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada AAG varian A menunjukkan perbezaan yang jelas dalam orientasinya, di mana 7-OH-MTG (Rajah 4.20B) agak kelihatan lebih terbenam dalam saku pengikatan berbanding MTG (Rajah 4.20A). Walaupun begitu, daya intermolekul yang bertanggungjawab untuk menstabilkan kompleks protein–ligan adalah sangat serupa seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.28 dan dijelaskan dengan terperinci dalam Jadual 4.10. Keserupaan dalam profil daya intermolekul ini mungkin menerangkan nilai tenaga pengikatan yang hampir sepadan bagi kedua-dua kompleks. Terdapat dua ikatan hidrogen konvensional terlibat dalam kompleks ligan–AAG varian A, melibatkan residu asid amino Gln-66 dan Thr-47 (Rajah 4.28AI) bagi MTG, serta Gln-66 dan Arg-90 bagi 7-OH-MTG (Rajah 4.28BI). Selain itu, ikatan hidrogen karbon yang lebih lemah juga terlibat dalam kestabilan kompleks ini dengan lima ikatan dikenal pasti bagi kompleks MTG–AAG varian A dan tiga ikatan bagi kompleks 7-OH-MTG–AAG varian A. Rajah 4.28AII dan Rajah 4.28BII menunjukkan kawasan permukaan ikatan hidrogen di sekitar lokasi pengedokan MTG dan 7-OH-MTG pada AAG varian A.

Tambahan lagi, sifat ligan-ligan yang tak berkutub ini memudahkan pembentukan pelbagai ikatan hidrofobik. Perbezaan antara persekitaran hidrofilik dan hidrofobik sekitar MTG dan 7-OH-MTG adalah ditunjukkan dalam Rajah 4.28AIII dan Rajah 4.28BIII. Terdapat pelbagai interaksi pi-sigma yang melibatkan pemindahan cas antara residu asid amino aromatik berlebihan elektron (Tyr-27, Tyr-37, dan Phe-112) dan moiety 7-OH-MTG yang kekurangan elektron menyumbang kepada kestabilan 7-OH-MTG pada tapak pengikatan. Ini berbeza dengan pengikatan MTG yang hanya melibatkan satu interaksi pi-



Rajah 4.28 Gambar rajah skematik Biovia Discovery Studio bagi interaksi residu asid amino AAG varian A dengan (A) MTG dan (B) 7-OH-MTG. (I) Daya intermolekul dan asid amino yang terlibat, (II) permukaan ikatan hidrogen dan (III) permukaan hidrofobik pada tapak pengikatan AAG varian A.

Jadual 4.10 Jenis-jenis interaksi, residu asid amino yang terlibat dan jarak intermolekul dalam pengkompleksan AAG varian A dengan MTG dan 7-OH-MTG

Kompleks	Kategori ikatan	Jenis ikatan	Tempat interaksi	Jarak (Å)
AAG varian A + MTG	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrogen konvensional	A:GLN66:HE21 - : LIG1:O	2.27
			A:THR47:HG1 - : LIG1:O	1.67
		Ikatan hidrogen karbon	LIG1:C - A:GLU92:OE2	3.74
			LIG1:C - A:TYR37:OH	3.22
			LIG1:C - A:VAL98:O	2.85
			LIG1:C - A:SER114:OG	3.28
	LIG1:C - A:GLU64:OE2	3.16		
	Interaksi hidrofobik	Pi-sigma	A:ALA99:CB - : LIG1	3.68
			LIG1 - A:ARG90	4.99
		Pi-alkil	A:PHE49 - : LIG1:C	4.63
			A:TYR127 - : LIG1:C	4.82
			A:TYR27 - : LIG1:C	4.65
			A:TYR37 - : LIG1:C	5.21
			LIG1 - A:ALA99	4.85
LIG1:C - A:ILE44			5.39	
A:ALA99 - : LIG1:C	3.28			
AAG varian A + 7-OH-MTG	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrogen konvensional	A:GLN66:HE22 - : LIG2:O	2.03
			A:ARG90:NH1 - : LIG2:O	3.10
		Ikatan hidrogen karbon	LIG2:C - A:GLU92:OE2	3.42
			LIG2:C - A:ARG90:NH1	3.29
			A:ARG90:CD - : LIG2:O	3.06
			Interaksi hidrofobik	Pi-sigma
	LIG2:C - A:PHE112	3.60		
	LIG2:C - A:TYR27	3.78		
	Pi-alkil	A:PHE51 - : LIG2:C		4.95
		LIG2 - A:ARG90		4.05
		LIG2 - A:VAL88		5.43
		LIG2 - A:LEU79		5.32
		LIG2 - A:ALA99		4.46
	Alkil	LIG2:C - A:VAL41	4.97	
LIG2:C - A:VAL88		4.70		
LIG2:C - A:LEU79		4.73		

\*LIG1=MTG, LIG2=7-OH-MTG

sigma melalui residu asid amino alifatik Ala-99. Di samping itu, daya van der Waals juga lebih ketara dalam interaksi 7-OH-MTG dengan AAG (Rajah 4.28BI), dengan hampir seluruh molekul dikelilingi oleh residu asid amino yang terlibat dalam daya ini, menunjukkan bahawa 7-OH-MTG membentuk sentuhan yang lebih meluas dengan protein dibandingkan MTG (Rajah 4.28AI). Oleh kerana itu, pengkompleksan 7-OH-MTG pada AAG varian A adalah lebih stabil daripada MTG kerana tenaga pengikatannya diminimumkan oleh kehadiran interaksi pi-sigma dan van der Waals yang ketara.

Perbandingan residu-residu asid amino yang terlibat dalam pengkompleksan MTG–protein dan 7-OH-MTG–protein menunjukkan persamaan dengan beberapa kajian lepas. Contohnya, residu-residu asid amino (Leu-115, Arg-117, Pro-118, Tyr-138, Ile-142, Tyr-161, Arg-186) yang terlibat dalam pengkompleksan sebatian psikoaktif psilosibin dengan HSA (Khastar et al. 2020), adalah sama dengan residu asid amino yang terlibat dalam pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada subdomain IB HSA. Selain itu, pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG juga menunjukkan ciri-ciri yang sama dengan pengkompleksan ceritinib pada AAG varian F1\*S dari segi residu-residu asid amino yang terlibat, iaitu Tyr-37, Phe-114, Ile-88, Leu-112, Leu-79, Arg-90, Val-92 dan Val-41 (Wang et al. 2020a). Dalam kajian lain oleh Huang et al. (2012), pengikatan dadah disopiramida yang berafiniti tinggi pada AAG varian A ( $K_a = 4.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) melibatkan 13 residu asid amino (Tyr-27, Tyr-127, Arg-90, Gln-66, Ala-99, Val-98, Tyr-37, Ser-125, Val-41, His-97, Ser-89, Val-88, Leu-79) yang juga terlibat dalam pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG dengan protein ini. Ini menjelaskan bahawa walaupun ceritinib dan disopiramida mempunyai struktur yang berbeza daripada MTG dan 7-OH-MTG, namun ia mempamerkan mekanisme pengikatan yang serupa dengan MTG dan 7-OH-MTG. Ini membuktikan bahawa residu-residu asid amino di atas memainkan peranan penting dalam interaksi sebatian pada AAG.

Kesimpulannya, daya intermolekul yang terlibat dalam interaksi MTG dan 7-OH-MTG dengan kedua-dua, HSA dan AAG adalah daya bukan kovalen iaitu ikatan hidrogen (konvensional, hidrogen karbon), interaksi hidrofobik (pi-alkil, alkil, pi-sigma, pi “berbentuk T”) dan daya van der Waals. Profil daya intermolekul yang terlibat dalam

interaksi antara MTG dan 7-OH-MTG dengan HSA dan AAG secara umumnya adalah sepadan dengan tenaga pengikatan yang diperoleh daripada simulasi dok molekul.

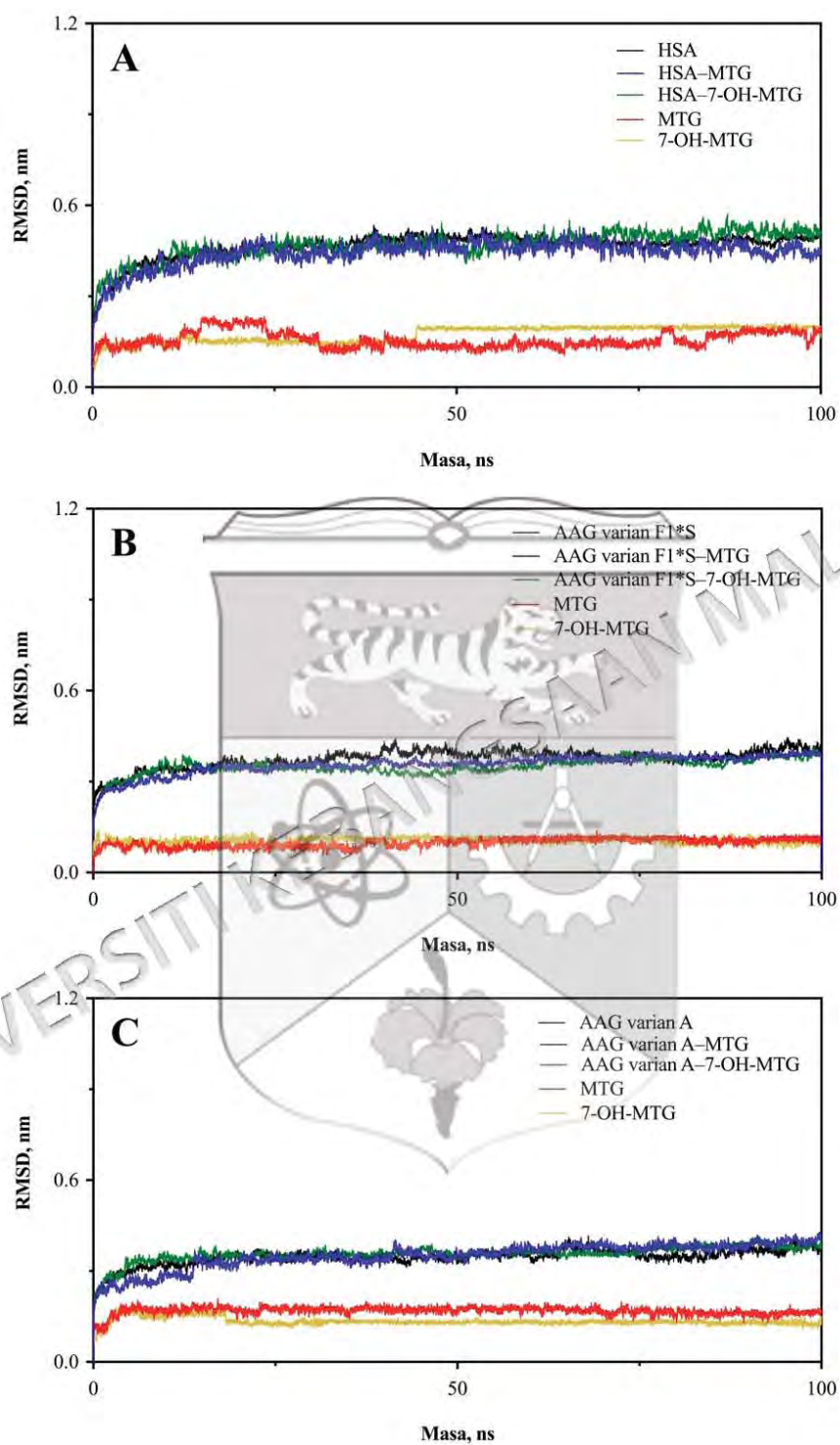
#### **4.6 KESAN PENGIKATAN MTG DAN 7-OH-MTG TERHADAP KESTABILAN DAN KEPADATAN HSA DAN AAG**

Kajian simulasi MD adalah kelakuan komputasional sesuatu sistem berdasarkan masa, dan telah berkembang menjadi alat yang efektif untuk memahami interaksi antara protein dan ligan serta meramalkan bagaimana perubahan konformasi berlaku (Salo-Ahen et al. 2020). Penerokaan ruang konformasi kompleks protein–ligan pada peringkat atom melalui simulasi MD akan membantu memahami tenaga keseluruhan, peralihan antara struktur lipatan protein, serta kestabilan dan fleksibiliti struktur sistem molekul.

##### **4.6.1 Kestabilan dan fleksibiliti konformasi protein**

Dua metrik yang sering digunakan untuk menilai fleksibiliti dan perubahan konformasi protein, yang berfungsi sebagai indikator kestabilan kompleks protein–ligan, adalah punca min sisihan kuasa dua (RMSD) dan fluktuasi punca min kuasa dua (RMSF). RMSD, merupakan suatu ukuran kuantitatif bagi jarak purata antara atom-atom yang sepadan dalam struktur yang berbeza. Penurunan nilai RMSD relatif menunjukkan perubahan konformasi protein yang kurang ketara di antara keadaan tidak terikat dan terikat, yang mencerminkan peningkatan kekakuan dan kestabilan. Julat nilai RMSD antara 0.1–0.3 nm adalah dianggap wajar bagi perubahan konformasi protein globular, dengan kestabilan struktur yang dapat diterima (Naik et al. 2018).

Berdasarkan pada Rajah 4.29A, HSA dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG telah mencapai fasa ekuilibrium tanpa sebarang anjakan besar. Nilai RMSD HSA natif adalah stabil pada  $\sim 0.47$  nm dari sekitar 40 ns hingga akhir simulasi, selari dengan nilai daripada laporan sebelum ini (Shahlaei et al. 2015; Shamsi et al. 2022). Nilai RMSD untuk kedua-dua kompleks MTG–HSA dan kompleks 7-OH-MTG–HSA adalah sebanding dengan protein tak terikat. Meskipun demikian, kehadiran MTG menghasilkan penurunan nilai RMSD protein yang kecil namun signifikan berbanding 7-OH-MTG. Ini menunjukkan

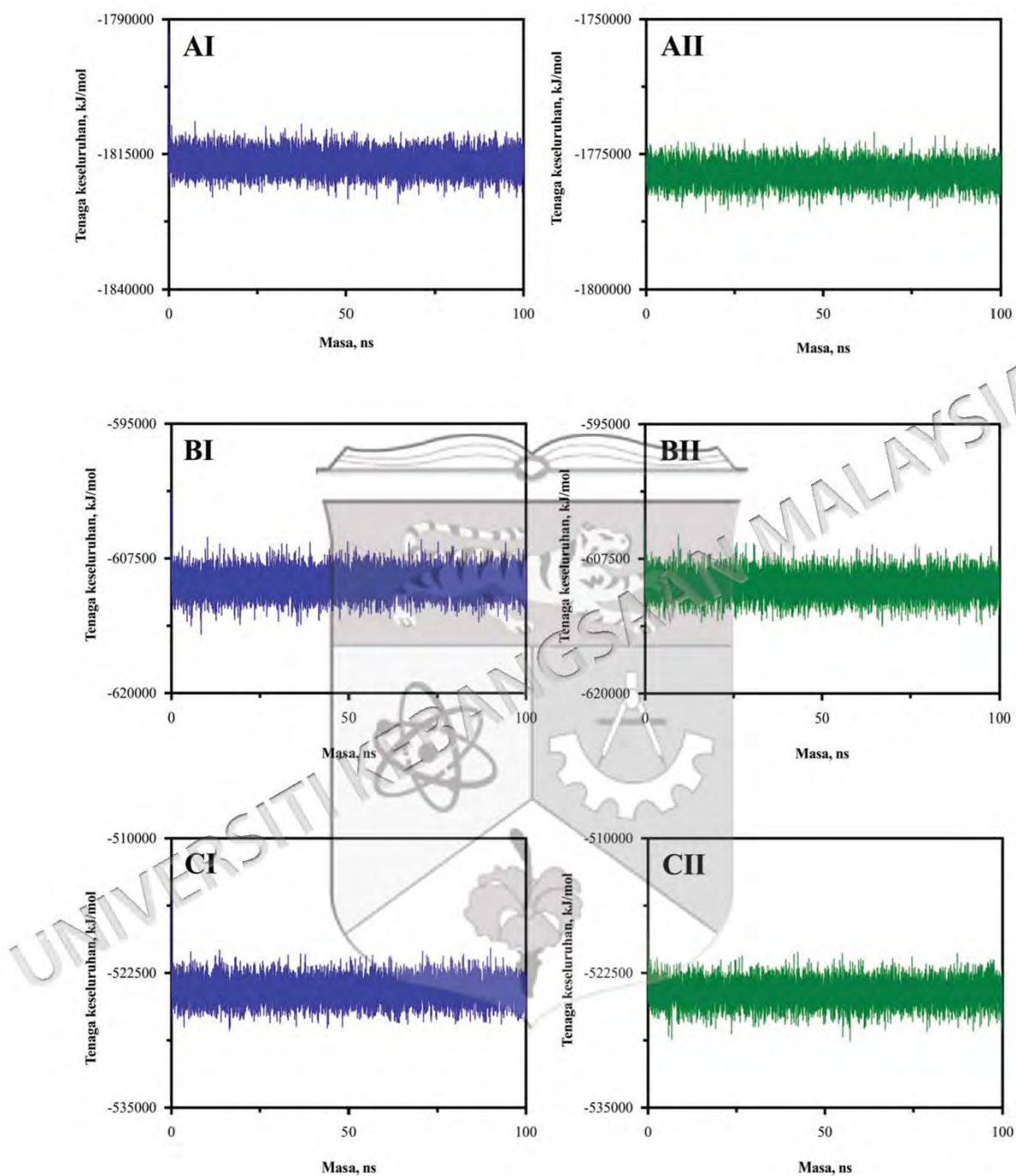


Rajah 4.29 Plot RMSD bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1\*S dan (C) AAG varian A dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG melawan masa simulasi.

kestabilan relatif yang lebih tinggi untuk MTG di lokasi pengikatan. Hasil ini selaras dengan analisis dok molekul sebelum yang menunjukkan tenaga pengikatan lebih rendah dan profil daya intermolekul yang lebih baik bagi MTG berbanding 7-OH-MTG untuk interaksi dengan HSA.

Bagi protein AAG, nilai RMSD dalam keadaan tak terikat bagi kedua-dua varian F1\*S dan A adalah antara 0.33 nm hingga 0.37 nm selepas 10 ns masa simulasi (Rajah 4.29B dan (Rajah 4.29C). Pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG dengan AAG varian F1\*S menunjukkan nilai RMSD yang lebih rendah berbanding protein tak terikat (30 ns – 60 ns), walaupun perbezaannya sangat kecil (Rajah 4.29B). Bagaimanapun, tidak ada perbezaan ketara dalam nilai RMSD sebelum dan selepas pengkompleksan AAG varian A dengan MTG dan 7-OH-MTG (Rajah 4.29C). Nilai RMSD bagi MTG dan 7-OH-MTG menunjukkan nilai yang rendah iaitu sekitar 0.15 nm, yang menunjukkan kestabilan interaksinya dengan protein. Terdapat juga fluktuasi kecil dalam nilai RMSD pada awal simulasi yang mungkin disebabkan oleh penyesuaian dan persediaan sistem ini (Shamsi et al. 2022). Secara keseluruhannya, semua kompleks kekal stabil sepanjang 100 ns masa simulasi dengan sedikit peralihan konformasi, menunjukkan keserupaan struktur di antara keadaan protein natif dan terikat.

Tenaga keseluruhan yang merangkumi tenaga kinetik dan tenaga keupayaan juga penting untuk memahami keadaan dinamik dan kestabilan struktur sistem. Plot jumlah tenaga bagi kesemua kompleks protein–ligan adalah ditunjukkan dalam Rajah 4.30, dengan nilai purata jumlah tenaga keseluruhan pada Jadual 4.11. Nilai tenaga yang negatif ( $-1\ 816\ 450\ \text{kJ mol}^{-1}$ ) menunjukkan bahawa interaksi antara MTG dan HSA adalah kuat dan stabil. Walaupun nilai ini adalah kurang negatif bagi 7-OH-MTG ( $-1778\ 640\ \text{kJ mol}^{-1}$ ), namun interaksinya dengan HSA masih dianggap stabil. Sementara itu, kompleks MTG dan 7-OH-MTG dengan kedua-dua varian AAG menunjukkan purata jumlah tenaga keseluruhan hampir sama (Jadual 4.11), menunjukkan bahawa kesemua kompleks mempunyai tahap kestabilan yang hampir setara dengan interaksi yang kuat. Oleh itu, dapat disimpulkan bahawa kompleks-kompleks ini adalah stabil, menyokong dapatan RMSD sebelumnya yang menunjukkan kestabilan struktur sepanjang tempoh simulasi.

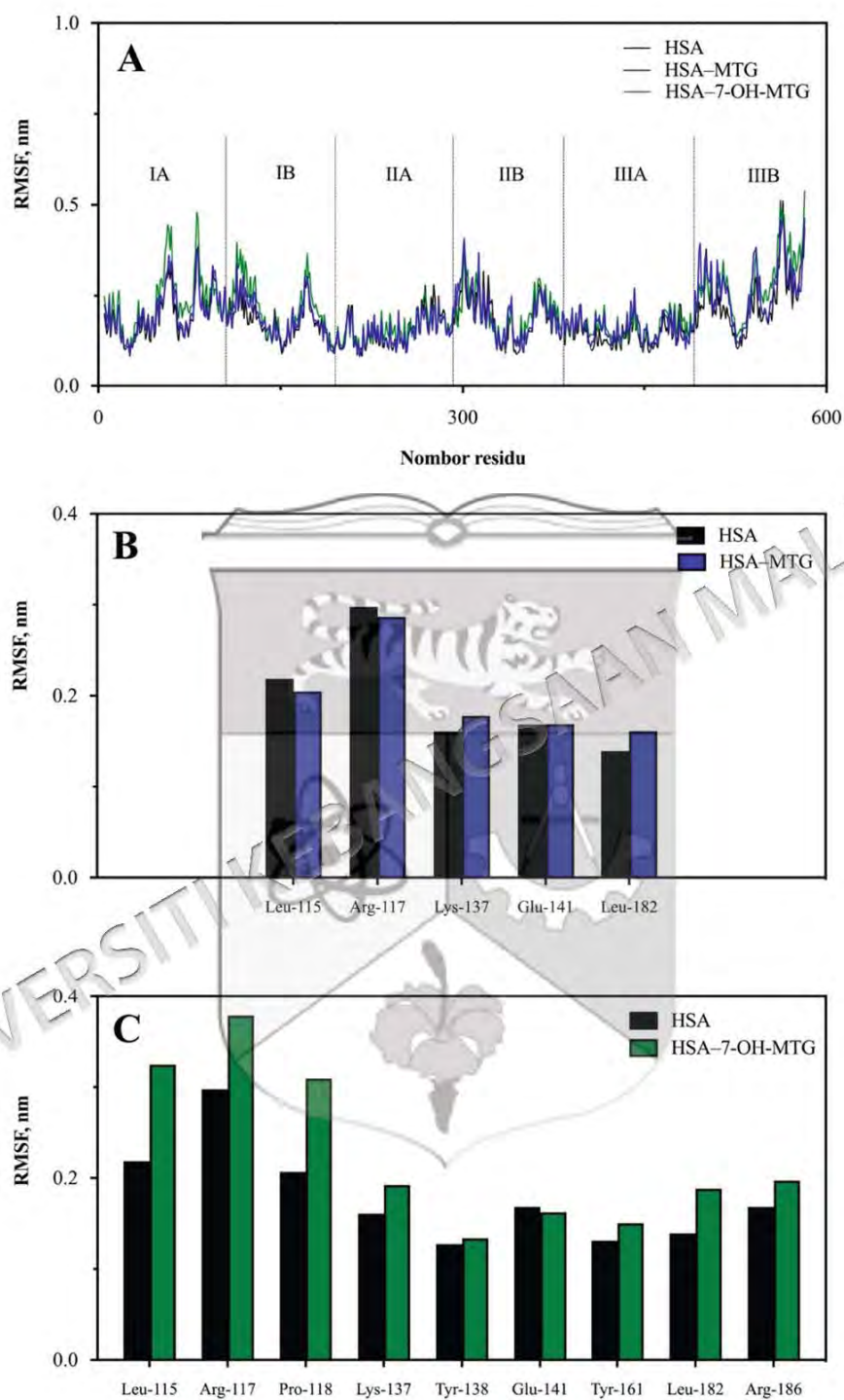


Rajah 4.30 Plot tenaga keseluruhan bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1\*S dan (C) AAG varian A tanpa dan dengan kehadiran (I) MTG dan (II) 7-OH-MTG (II) melawan masa simulasi.

Jadual 4.11 Purata jumlah tenaga keseluruhan bagi kompleks MTG dan 7-OH-MTG dengan HSA, AAG varian F1\*S dan AAG varian A

Kompleks	Jumlah tenaga (kJ mol <sup>-1</sup> )
MTG–HSA	-1816450
7-OH-MTG–HSA	-1778640
MTG–AAG varian F1*S	-609799
7-OH-MTG–AAG varian F1*S	-609920
MTG–AAG varian A	-524169
7-OH-MTG–AAG varian A	-524359

RMSF, yang mengukur purata sisihan residu protein melawan masa, juga umum digunakan untuk menilai fleksibiliti dan peralihan konformasi protein. Perbandingan RMSF bagi residu HSA dan AAG dalam keadaan tak terikat dan terikat ligan adalah digambarkan dalam Rajah 4.31–4.33. Plot RMSF pada Rajah 4.31A menunjukkan bahawa kompleks MTG–HSA dan 7-OH-MTG–HSA mempunyai nilai RMSF yang hampir serupa dengan HSA natif sepanjang simulasi, kecuali bagi beberapa residu yang membentuk subdomain IB, di mana tapak dadah III terletak. Residu-residu ini, yang termasuk Leu-115, Arg-117, Lys-137 dan Leu-182, mempamerkan nilai RMSF yang hanya berbeza sedikit dengan kehadiran MTG (Rajah 4.31B). Sebaliknya, pengikatan 7-OH-MTG pada HSA menyebabkan peningkatan kecil dalam nilai RMSF bagi beberapa residu asid amino pada tapak ini, terutamanya Leu-115, Arg-117 dan Pro-118 (Rajah 4.31C). Hasil ini menunjukkan bahawa walaupun kedua-dua kompleks ligan–HSA mempunyai struktur yang secara relatifnya stabil dan kaku, namun fleksibiliti setempat saku pengikatan MTG adalah lebih rendah berbanding dengan residu yang membentuk tapak pengikatan 7-OH-MTG. Tambahan juga, kawasan gelung pada struktur protein yang biasanya lebih fleksibel daripada kawasan lain protein, adalah berpadanan dengan residu yang mempunyai nilai RMSF yang tinggi (Shamsi et al. 2022).

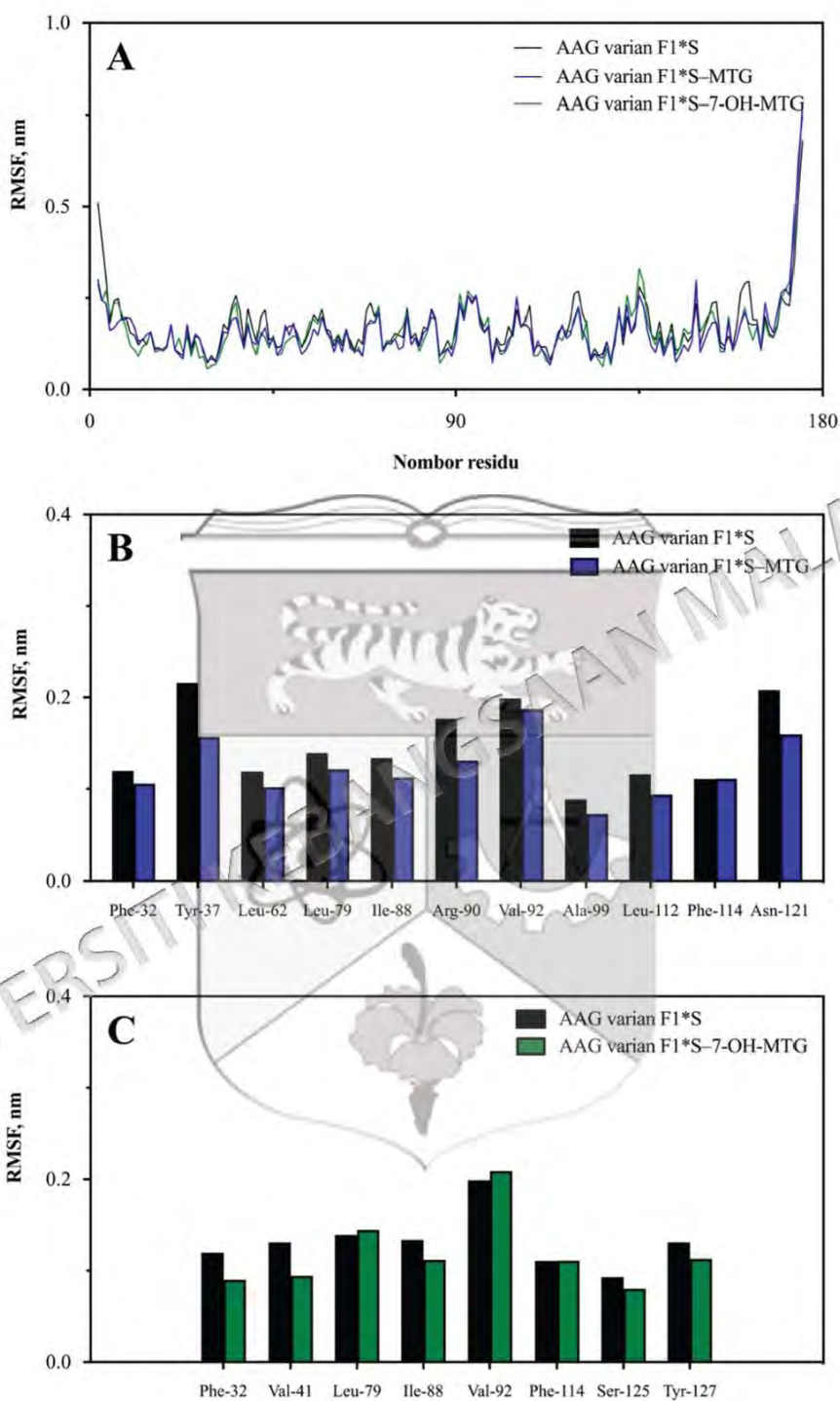


Rajah 4.31 (A) Plot RMSF bagi HSA dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG yang disusun mengikut subdomain. Fluktuasi RMS bagi residu tertentu pada tapak pengikatan III di subdomain IB tanpa dan dengan kehadiran (B) MTG dan (C) 7-OH-MTG.

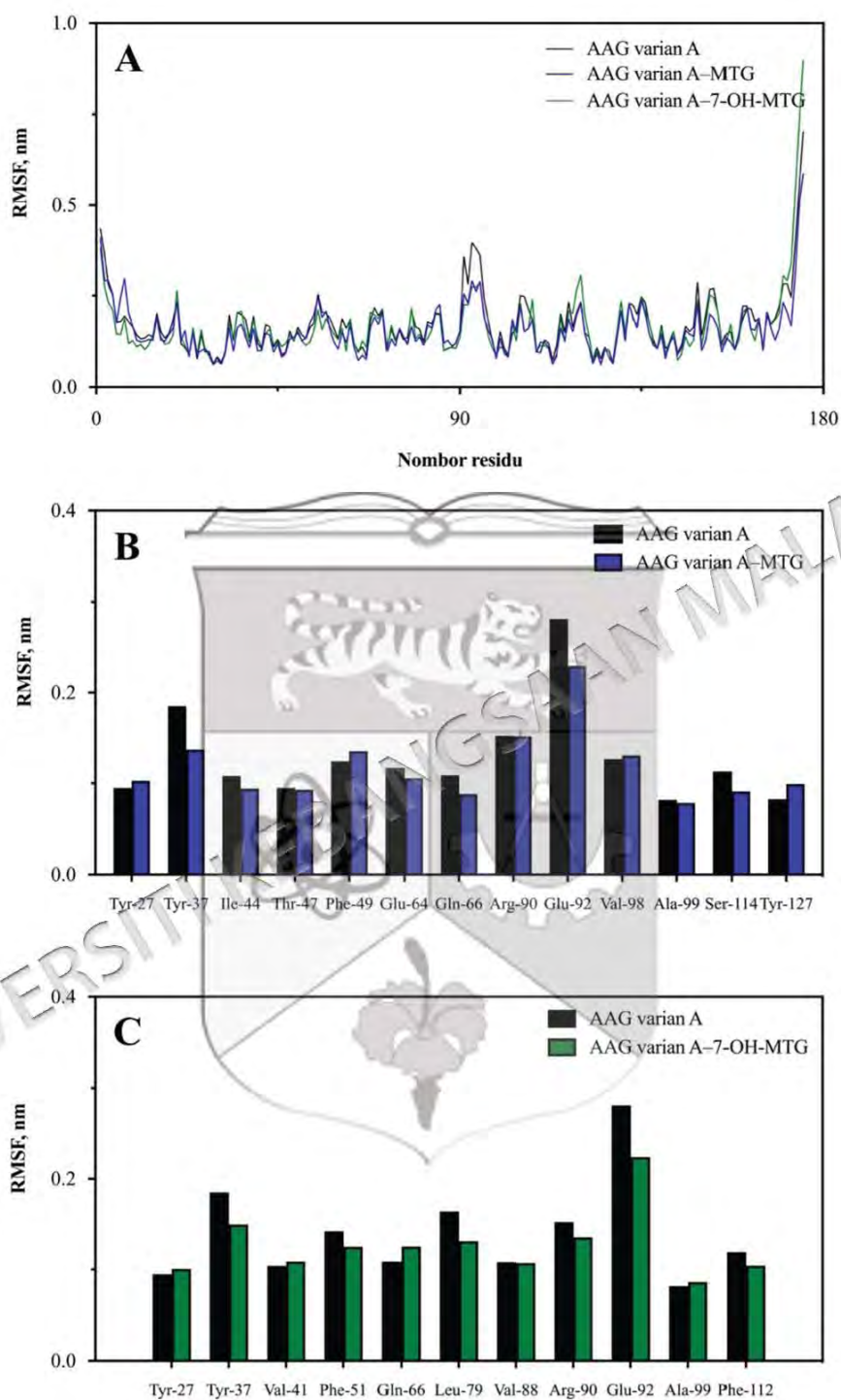
Analisis nilai RMSF bagi kompleks AAG dengan MTG dan 7-OH-MTG pula menunjukkan fluktuasi yang hampir serupa berbanding protein bebas, seperti yang dipamerkan di dalam Rajah 4.32A dan Rajah 4.33A untuk varian F1\*S dan A. Berbeza dengan HSA, fluktuasi atom bagi residu varian F1\*S yang terlibat dalam interaksi dengan MTG (Rajah 4.32B) dan juga 7-OH-MTG (Rajah 4.32C) di dalam saku pengikatan pusat adalah lebih rendah berbanding dengan protein natif (tak terikat). Hasil yang sama juga diperhatikan untuk AAG varian A, yang melibatkan residu Tyr-37, Ile-44, Thr-47, Glu-64, Gln-66, Glu-92, Ala-99 dan Ser-114 bagi pengikatan dengan MTG (Rajah 4.33B), dan Tyr-37, Phe-51, Leu-79, Arg-90, Glu-92 dan Phe-112 bagi pengikatan dengan 7-OH-MTG (Rajah 4.33C). Data simulasi ini menyokong pembentukan interaksi yang stabil antara MTG dan 7-OH-MTG dengan kedua-dua varian AAG, dengan peningkatan kekakuan protein di sekitar tapak pengikatan (Dubey et al. 2018). Secara keseluruhannya, saku pengikatan kedua-dua protein menunjukkan penyesuaian untuk menampung ligan secara efektif, melibatkan penyusunan semula struktur yang mempengaruhi fleksibiliti setempat tapak pengikatan, sejajar dengan laporan terdahulu (Hu et al. 2024; Jiang et al. 2023; Yeggoni et al. 2015).

#### **4.6.2 Kepadatan dan perlipatan protein**

Simulasi dinamik molekul juga boleh digunakan untuk menilai lipatan dan kepadatan keseluruhan protein berdasarkan parameter seperti jejari legaran ( $R_g$ ) dan luas permukaan yang boleh diakses pelarut (SASA).  $R_g$  adalah ditakrifkan sebagai taburan atom dalam protein sekeliling paksi putaran dan digunakan untuk menggambarkan trajektori dinamik protein untuk menilai kepadatannya (Lobanov, Bogatyreva & Galzitskaya 2008). Taburan jisim yang lebih dekat kepada paksi direfleksikan oleh nilai  $R_g$  yang kecil, yang menunjukkan sistem yang lebih padat. Sebaliknya, nilai  $R_g$  yang besar menerangkan sistem yang mengalami pembukaan lipatan (Lobanov, Bogatyreva & Galzitskaya 2008). Dalam kajian ini, kepadatan struktur bagi kedua-dua protein plasma, HSA dan AAG setelah pengikatan dengan MTG dan 7-OH-MTG dinilai berdasarkan nilai  $R_g$  bagi setiap sistem seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.34.



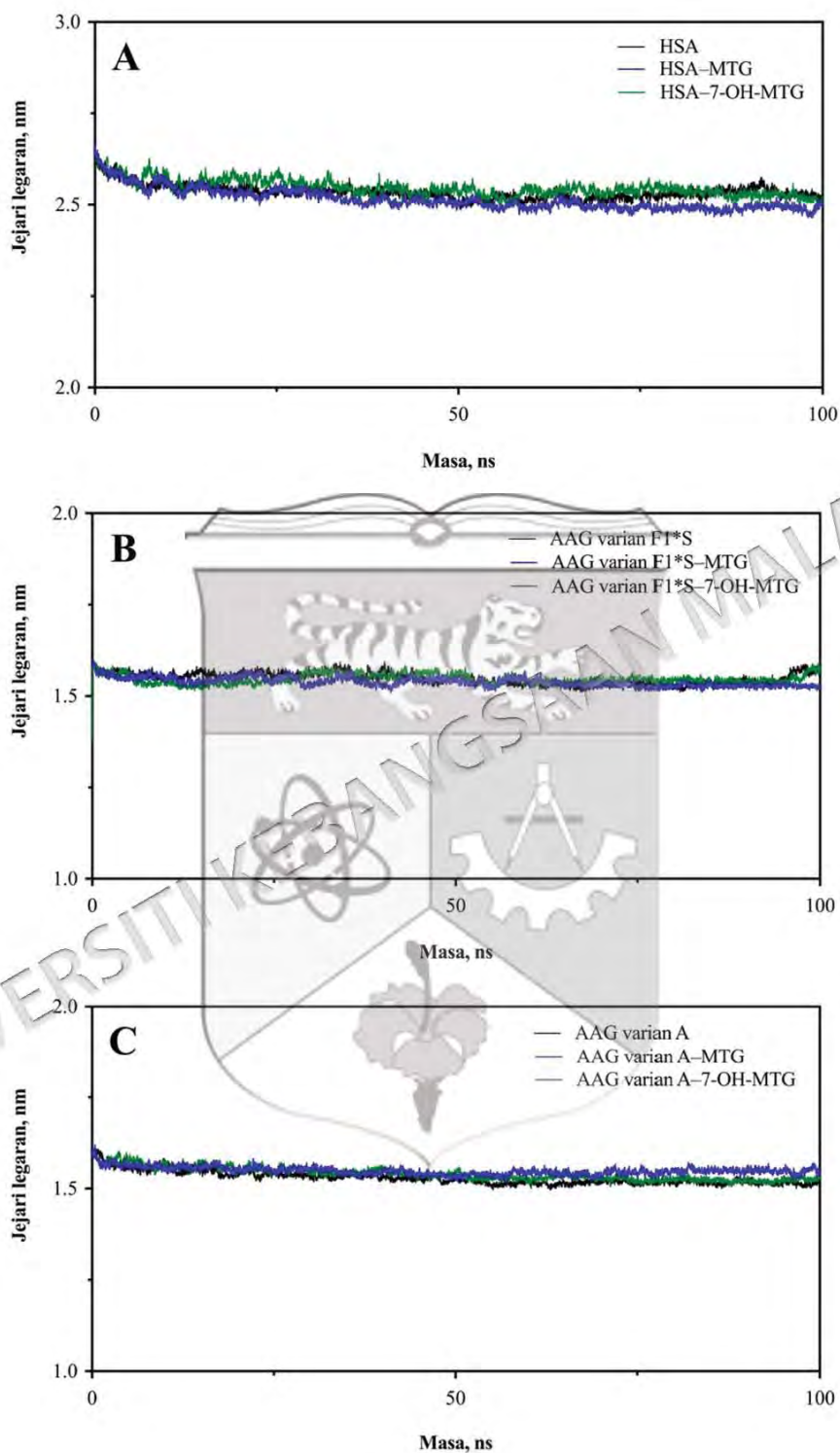
Rajah 4.32 (A) Plot RMSF bagi AAG varian F1\*S dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG. Fluktuasi RMS bagi residu tertentu pada saku pengikatan hidrofobik AAG varian F1\*S tanpa dan dengan kehadiran (B) MTG dan (C) 7-OH-MTG.



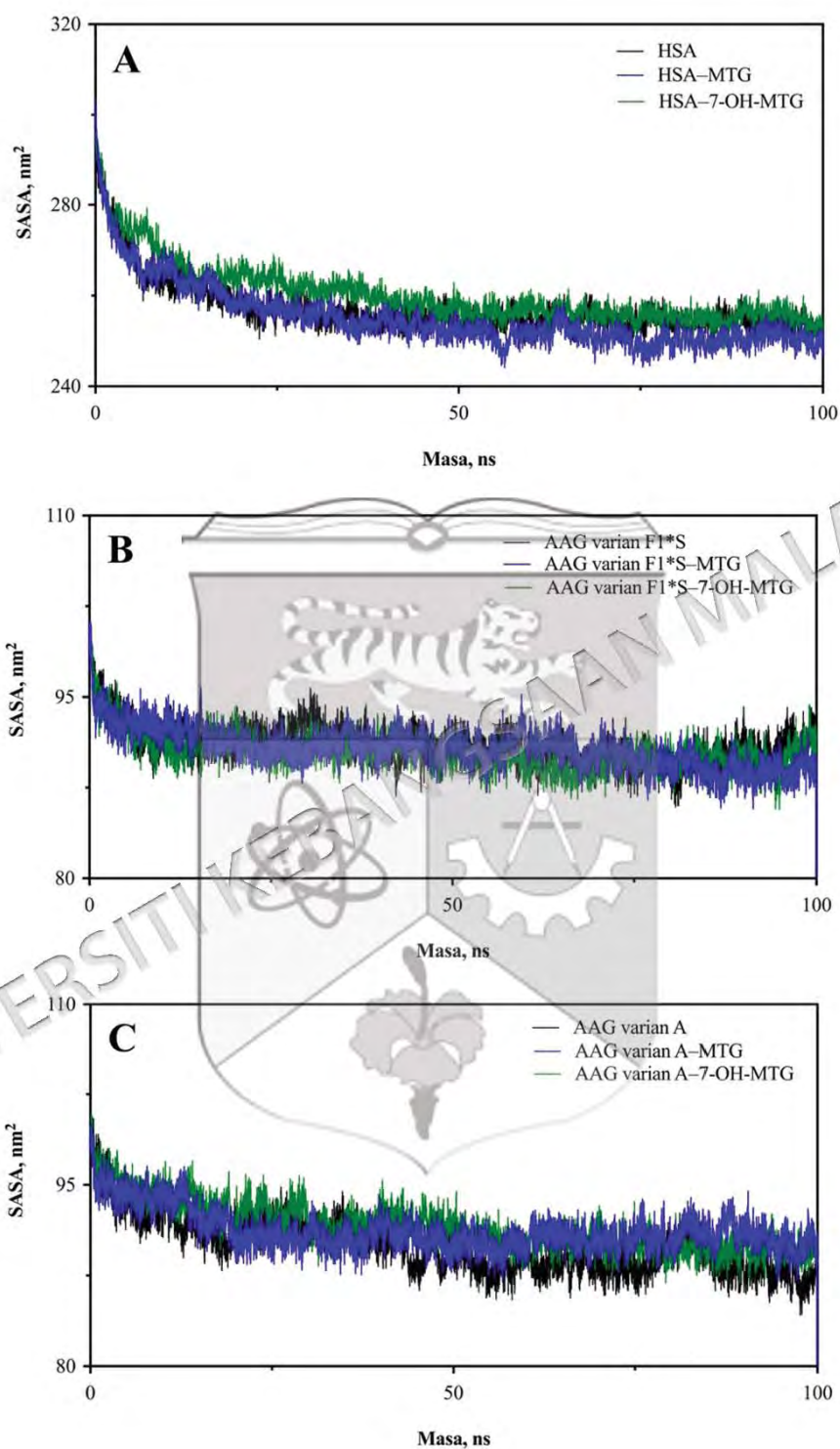
Rajah 4.33 (A) Plot RMSF bagi AAG varian A dan kompleksnya dengan MTG dan 7-OH-MTG. Fluktuasi RMS bagi residu tertentu pada saku pengikatan hidrofobik AAG varian A tanpa dan dengan (B) MTG dan (C) 7-OH-MTG.

Nilai purata Rg bagi HSA bebas serta kompleks MTG–HSA dan 7-OH-MTG–HSA semasa 60 ns terakhir simulasi adalah 2.57, 2.54 dan 2.58 nm (Rajah 4.34A). Sebagai perbandingan, nilai Rg yang ditentukan secara eksperimen bagi HSA natif dalam larutan akues adalah 2.74 nm berdasarkan eksperimen penyerakan neutron (Kiselev et al. 2001). Penurunan nilai Rg bagi HSA dengan kehadiran MTG menunjukkan struktur yang lebih padat (Rajah 4.34A). Hasil ini sama dengan kajian terdahulu yang melaporkan perubahan konformasi yang serupa pada HSA apabila berikatan dengan ligan lainnya (Nagati et al. 2019; Yeggoni et al. 2015). Walau bagaimanapun, perlu diingatkan bahawa perubahan dalam Rg yang diperhatikan dalam simulasi ini adalah agak kecil. Sebagai protein yang lebih kecil, kedua-dua varian F1\*S (Rajah 4.34B) dan A (Rajah 4.34C) AAG menunjukkan nilai purata Rg ~1.55 nm setelah mencapai keseimbangan. Kajian lain juga menunjukkan nilai Rg bagi protein AAG yang sebanding dengan nilai yang diperoleh iaitu 1.61 (Jiang et al. 2023; Wang et al. 2020b). Walau bagaimanapun, kehadiran MTG atau 7-OH-MTG tidak membawa perubahan yang ketara kepada nilai Rg bagi kedua-dua varian AAG, yang mungkin disebabkan oleh sifat semulajadi protein ini yang padat (Schönfeld et al. 2008).

SASA adalah didefinisikan sebagai kawasan permukaan biomolekul yang terdedah kepada pelarut yang mengelilingi permukaan van der Waals molekul tersebut (Kharazian, Ahmad & Mabudi 2021). Nilai SASA protein adalah ukuran pendedahan asid amino kepada pelarut sekitarnya dan merupakan petunjuk penting tentang lipatan dan kestabilan protein. Seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.35A, nilai SASA bagi HSA dan kompleksnya dengan 7-OH-MTG hampir serupa selepas 70 ns masa simulasi, sementara kompleks MTG–HSA mempunyai nilai yang ketara lebih rendah. Ini menunjukkan bahawa interaksi dengan MTG menyebabkan beberapa residu yang berada di dalam terlindung daripada permukaan dan lipatan protein menjadi lebih padat, yang selari dengan peningkatan kepadatannya berdasarkan nilai Rg seperti yang dinyatakan sebelumnya. Perbezaan kesan MTG dan 7-OH-MTG terhadap nilai SASA HSA dapat dijelaskan oleh orientasi pengikatan yang berbeza di tapak pengikatan. Sebaliknya, terdapat pertindihan besar dalam fluktuasi SASA bagi AAG varian F1\*S (Rajah 4.35B) dan A (Rajah 4.35C) tanpa dan dengan kehadiran ligan, yang menunjukkan tiada perubahan yang ketara dalam perlipatan protein apabila MTG dan 7-OH-MTG mengikat pada protein. Namun, perlu ditekankan bahawa



Rajah 4.34 Plot jejari legaran bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1\*S dan (C) AAG varian A tanpa dan dengan kehadiran MTG dan 7-OH-MTG melawan masa simulasi. Hasil ini diperoleh daripada analisis data simulasi dinamik molekul.



Rajah 4.35 Plot SASA bagi (A) HSA, (B) AAG varian F1\*S dan (A) AAG varian A tanpa dan dengan MTG dan 7-OH-MTG melawan masa simulasi. Hasil ini diperoleh daripada analisis data simulasi dinamik molekul.

perbezaan dalam Rg dan SASA yang diperoleh dalam simulasi ini adalah agak kecil. Perbezaan yang minimum ini juga menerangkan kestabilan kompleks AAG–ligan, seperti yang dijelaskan sebelumnya.

Secara keseluruhannya, pengkompleksan MTG dan 7-OH-MTG dengan kedua-dua protein plasma menunjukkan kestabilan yang baik dan mencadangkan bahawa kedua-dua sebatian ketum mempamerkan keafinan pengikatan yang sesuai bagi untuk keberkesanan terapeutik. Interaksi yang stabil berkemungkinan berkolerasi dengan profil farmakokinetik yang baik seperti yang dibincangkan sebelum ini dalam analisis keserupaan dadah. Kestabilan ini juga menyumbang kepada aktiviti dadah yang berpanjangan di dalam sistem *in vivo*. Ini memberi maklumat asas mengenai kedua-dua sebatian ini sebagai calon analgesik baru dalam mengatasi masalah sindrom sarak bagi ketagihan opioid dengan profil keberkesanan dan keselamatan yang dipertingkatkan.

## BAB V

### KESIMPULAN

#### 5.1 RUMUSAN KAJIAN

Interaksi protein–ligan mempengaruhi profil farmakodinamik dan farmakokinetik sesuatu dadah kerana kepekatan dadah bebas yang berada pada tapak sasaran menentukan kelakuan dadah. Secara rumusannya, kajian ini menerangkan mekanisme interaksi sebatian psikoaktif ketum, iaitu MTG dan 7-OH-MTG, dengan protein plasma manusia, khususnya HSA dan AAG, serta menilai profil farmakokinetik kedua-dua sebatian ini. Teknik biofizik seperti multispektroskopi, kalorimetri dan mikroskopi telah digunakan untuk mencirikan profil pengikatan dan teknik bioinformatik seperti simulasi dok molekul dan dinamik molekul untuk memahami lebih lanjut lokasi pengikatan ligan dan kestabilan kompleks protein–ligan. Manakala, penilaian ciri-ciri farmakokinetik telah dijalankan menggunakan perisian SwissADME, OSIRIS Property Explorer dan pkCSM.

Berdasarkan analisis profil farmakokinetik, kedua-dua MTG dan 7-OH-MTG menunjukkan potensi tinggi sebagai calon terapeutik. Kedua-dua sebatian ini diramalkan mempunyai sifat keserupaan dadah yang menjangkakan penyerapan oral yang baik, serta menunjukkan kesesuaian farmakologi dan risiko ketoksikan yang rendah melalui data SwissADME, OSIRIS Property Explorer dan pkCSM. Selain itu, kaedah spektroskopi pendarfluor menunjukkan perubahan spektrum pendarfluor protein dan analisis ITC menunjukkan perubahan haba disebabkan mekanisme pengikatan MTG–protein. Keafinan pengikatan adalah dikategorikan sebagai sederhana bagi kedua-dua kompleks MTG–HSA dan MTG–AAG, namun MTG mengikat lebih kuat kepada AAG berbanding HSA. Hasil ini menyokong keberkesanan pengangkutan MTG dalam darah tanpa mengurangkan bioketersediaannya secara ketara. Hasil ini selari dengan kajian lepas dan menunjukkan

potensi struktur indol sebatian MTG dalam aspek farmakokinetik seperti pengedaran dan separuh hayat dadah.

Seterusnya, penyerapan UV mengesahkan pembentukan kompleks protein–MTG dan perubahan struktur protein, manakala spektroskopi pendarfluor 3D menunjukkan perubahan intensiti yang berkaitan dengan mikropersekitaran residu fluorofor. Analisis AFM pula menunjukkan peningkatan saiz agregat protein, membuktikan pengagregatan disebabkan oleh interaksi hidrofobik dengan MTG. Perubahan minimum struktur sekunder dan tertier protein disebabkan penambahan MTG dipamerkan oleh spektrum CD bagi AAG, namun tidak ketara bagi spektrum CD HSA. Oleh itu, hasil ini menerangkan bahawa pengikatan MTG berkemungkinan mempengaruhi kestabilan dan fungsi biologi AAG. Memahami perubahan struktur protein disebabkan interaksi dengan MTG adalah penting secara klinikal untuk meramal tindak balas biologi berikutan pemberiannya.

Hasil eksperimen sesaran dadah kompetitif jelas menunjukkan bahawa MTG tidak menyasarkan dadah yang mengikat pada tapak I dan II HSA. Walaupun eksperimen sesaran dadah ini tidak memberi maklumat konklusif tentang pengikatan MTG pada tapak III, hasil kajian dok molekul mengesahkan bahawa tapak III di subdomain IB ini adalah tapak pengikatan pilihan bagi MTG dan juga 7-OH-MTG pada HSA. Walau bagaimanapun, sebatian-sebatian ini menunjukkan orientasi yang berbeza di saku pengikatan HSA, dimana MTG terikat dengan lebih stabil berbanding sebatian derivatifnya. Bagi protein AAG pula, kedua-dua MTG dan 7-OH-MTG mengedok di tengah saku pengikatan bagi kedua-dua varian F1\*S dan A. Oleh itu, lokasi pengikatan MTG dan 7-OH-MTG pada protein plasma didapati adalah sama seperti kebanyakan dadah lain. Interaksi hidrofobik telah dikenalpasti sebagai daya intermolekul utama dalam pembentukan kompleks sebatian-sebatian ini dengan protein plasma, disokong oleh penglibatan ikatan hidrogen dan daya van der Waals. Pengikatan MTG pada tapak pengikatan HSA dan AAG berpotensi digunakan sebagai dadah bersama (*co-drug*) dalam terapi yang melibatkan dadah-dadah yang bergantung kepada protein plasma ini sebagai pengangkut utama.

Selanjutnya, kajian simulasi MD telah meneliti kesan pengikatan MTG dan 7-OH-MTG terhadap kestabilan dan kepadatan HSA dan AAG. Semua kompleks menunjukkan

trajektori stabil dengan perubahan konformasi yang minimum berbanding protein natif, seperti yang disokong oleh nilai RMSD dan RMSF yang rendah. Kepadatan dan lipatan kedua-dua protein setelah pengikatan dengan MTG dan 7-OH-MTG juga setanding dengan bentuk natifnya berdasarkan fluktuasi kecil yang diperhatikan dalam nilai Rg dan SASA. Namun begitu, penilaian parameter yang diperoleh daripada simulasi MD secara konsisten menunjukkan bahawa MTG berinteraksi lebih baik berbanding 7-OH-MTG dengan HSA. Hasil simulasi ini mengesahkan bahawa kompleks yang terbentuk adalah stabil dengan interaksi yang kuat.

Kajian ini telah menyumbang kepada pengetahuan sedia ada dengan menjelaskan interaksi MTG dan 7-OH-MTG dengan protein pengangkut plasma yang mempengaruhi profil farmakokinetik dan farmakodinamik dadah. Perubahan pengikatan ini boleh diambil kira dalam penentuan dos dan formulasi dadah sekiranya MTG digunakan dalam rawatan penyakit yang melibatkan perubahan tahap HSA dan AAG. Ini memberikan pandangan yang lebih mendalam tentang mekanisme pengikatan dan kestabilan sebatian-sebatian ini dengan protein plasma, sekaligus mengisi jurang pengetahuan tentang interaksi dadah-protein plasma dalam konteks terapeutik. Penyelidikan lanjut diperlukan untuk memahami sepenuhnya sifat dan potensi farmakologi sebatian MTG dan 7-OH-MTG, terutamanya dalam konteks pembangunan agen terapeutik yang efektif daripada ketum.

## 5.2 LIMITASI KAJIAN

Dalam pelaksanaan kajian ini, terdapat beberapa kekangan yang mempengaruhi pemahaman menyeluruh terhadap interaksi protein-ligan. Antaranya adalah hasil yang diperolehi menerusi pendekatan *in silico* menggunakan perisian SwissADME, Osiris Property Explorer dan pkCSM hanya memberikan pandangan awal yang berguna, tanpa pengesahan melalui eksperimen *in vitro* atau *in vivo*. Pendekatan ini adalah terhad kerana menggunakan algoritma dan parameter tertentu yang mungkin tidak merangkumi semua aspek farmakokinetik dan farmakodinamik. Selain itu, ketiadaan eksperimen *in vivo* boleh mengehadkan pemahaman terhadap kesan sebenar kelakuan sebatian dalam sistem biologi yang kompleks. Kajian *in vitro* yang dilakukan dalam kajian ini juga adalah tidak sepenuhnya menerangkan keadaan persekitaran sebenar dalam sistem manusia.

Selain itu, eksperimen biofizik dalam kajian ini hanya boleh dilakukan terhadap sebatian MTG sebagai ligan sasaran. Namun, tiada eksperimen dilakukan ke atas sebatian 7-OH-MTG disebabkan masalah ketersediaan sampel dan kos tinggi untuk pengekstrakan dan sintesis. Meskipun pendekatan bioinformatik diaplikasikan untuk interaksi 7-OH-MTG dengan kedua-dua protein plasma (HSA, AAG), namun kekurangan data eksperimental tidak dapat memberikan gambaran penuh tentang mekanisme interaksi ini.

Bagi kaedah simulasi dinamik, analisis *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA) dan *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area* (MM-GBSA), yang sering digunakan untuk mengukur tenaga bebas pengikatan dengan lebih tepat, tidak dapat dijalankan. Kekangan ini berpunca daripada penggunaan medan daya GROMOS, yang mempunyai limitasi teknikal tertentu dalam menjalankan analisis ini. Akibatnya, kajian ini tidak dapat memberikan penilaian kuantitatif dan terperinci terhadap kestabilan kompleks protein-ligan, yang mungkin menyokong keputusan dari eksperimen lain.

### 5.3 CADANGAN LANJUTAN

Cadangan lanjutan untuk penambahbaikan atau penambahan dalam kajian mengenai sebatian MTG dan 7-OH-MTG boleh dibahagikan kepada beberapa aspek utama iaitu kajian klinikal, mekanisme tindakan molekul, interaksi protein dan aplikasi terapeutik. Setiap aspek ini perlu diperhalusi dan diperluaskan bagi memastikan sebatian ini dapat digunakan secara efektif dan selamat dalam konteks klinikal.

Pengembangan kajian klinikal adalah penting untuk memastikan keselamatan dan keberkesanan sebatian MTG dan 7-OH-MTG dalam pelbagai keadaan atau faktor. Meskipun analisis farmakokinetik awal menunjukkan potensi MTG dan 7-OH-MTG, kajian klinikal fasa I hingga III perlu dijalankan bertujuan menilai keselamatan, dos optimum, keberkesanan, dan kesan sampingan sebatian ini. Pendekatan ini akan memberikan data yang lebih komprehensif dan dapat membantu dalam penilaian potensi terapeutik sebenar sebatian ini. Begitu juga, ujian terhadap populasi yang berbeza

(misalnya pesakit dengan patologi tertentu, pelbagai peringkat umur dan jantina) wajar dilakukan untuk mengeksplorasi variasi tindak balas individu terhadap sebatian-sebatian ini. Ini akan membantu dalam merangka garis panduan dos yang ideal dan strategi rawatan yang bersesuaian dengan keperluan pesakit.

Seterusnya, kajian mekanisme tindakan molekul yang lebih mendalam perlu dijalankan untuk memahami bagaimana MTG dan 7-OH-MTG berinteraksi dengan pelbagai molekul di dalam badan. Penyelidikan lanjutan yang menggunakan kaedah seperti kristalografi sinar-X dan spektroskopi resonans magnet nuklear (NMR) boleh menunjukkan struktur kompleks protein–ligan dengan lebih terperinci. Kristalografi sinar-X mengkaji struktur atom molekul, memberikan peta elektron terperinci untuk melihat posisi atom dalam ligan dan protein serta memahami interaksi dan perubahan konformasi. Manakala, NMR menggunakan sifat magnetik nukleus atom dalam medan magnet yang kuat untuk menunjukkan persekitaran kimia dan struktur molekul dalam larutan tanpa penghabluran. Untuk memahami kesan keseluruhan sebatian ini terhadap badan manusia, kajian juga perlu dilakukan mengenai cara ia berinteraksi dengan enzim dan reseptor lain yang mungkin terlibat dalam proses farmakologinya.

Sebagai tambahan kepada HSA dan AAG, sebatian MTG dan 7-OH-MTG mungkin berinteraksi dengan pelbagai protein plasma (transthyretin dan ceruloplasmin) serta protein membran lain (reseptor G-protein dan pengangkut kaset pengikat ATP (ABC)) yang juga mempengaruhi profil farmakokinetik dan farmakodinamik. Penyelidikan ini akan memberikan gambaran yang lebih komprehensif tentang bagaimana MTG dan 7-OH-MTG berinteraksi dalam persekitaran biologi yang sebenar dan membantu dalam meramalkan kesan sampingan ubat yang tidak diingini.

Selain daripada penyakit neurodegeneratif, kajian lanjut boleh menumpukan kepada potensi penggunaan MTG dan 7-OH-MTG dalam merawat pelbagai jenis penyakit lain seperti kanser, penyakit kardiovaskular, dan penyakit autoimun. Penyelidikan praklinikal menggunakan model haiwan dan kajian selular boleh membantu dalam mengenal pasti potensi terapeutik sebatian ini dalam pelbagai konteks penyakit. Selain itu,

penyelidikan mengenai penggunaan kombinasi sebatian ini dengan ubat lain boleh membuka peluang untuk strategi rawatan yang lebih berkesan dan sinergistik.

Secara keseluruhannya, penambahan dan penambahbaikan ini akan membantu dalam memastikan sebatian MTG dan 7-OH-MTG dapat dikembangkan menjadi ubat yang berkesan dan selamat untuk pelbagai aplikasi terapeutik. Di banyak negara, ketum berada di bawah pengawasan ketat atau dilarang sama sekali kerana kebimbangan terhadap penyalahgunaan dan risiko kesihatan. Oleh itu, memahami sepenuhnya potensi terapeutik dan risiko ketum serta komponennya adalah penting untuk merumuskan dasar dan undang-undang yang lebih seimbang. Penemuan tentang mekanisme molekul dan interaksi protein dengan sebatian ini dapat membantu dalam merumuskan garis panduan klinikal dan peraturan yang sesuai untuk penggunaannya.

#### 5.4 PROSPEK MASA DEPAN BERKAITAN KETUM

Sebatian terbitan ketum seperti MTG dan 7-OH-MTG menunjukkan potensi untuk kesan analgesik dan antinosisseptif, namun ini masih dalam peringkat awal dan memerlukan banyak penyelidikan untuk mengesahkan keselamatan dan keberkesanannya. Sehingga kini, masih tiada ubat yang berasaskan sebatian ketum yang diluluskan oleh pihak *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) di Amerika Syarikat atau *European Medicines Agency* (EMA) di Eropah. Oleh itu, kajian lanjut perlu dilakukan untuk mengembangkan potensi ketum dalam rawatan kesakitan kronik, ketagihan, dan keadaan kesihatan mental seperti kemurungan. Ini seterusnya boleh membuka jalan kepada kemungkinan sama ada penggunaan ketum akan diiktiraf sebagai rawatan yang sah dan diterima secara meluas di masa hadapan jika keselamatan dan keberkesanan dapat dibuktikan melalui penyelidikan yang komprehensif.

Status undang-undang berkaitan ketum dan sebatian terbitannya adalah berbeza-beza di setiap negara, sama ada diharamkan, dibenarkan atau diharuskan dengan bersyarat. Sebagai contoh, penggunaan ketum adalah diharamkan di sesetengah negara seperti Malaysia, Indonesia, Ireland, Itali dan Rusia, sementara penggunaan, pengeluaran, pemilikan, dan penjualan ketum di Thailand adalah sah setelah undang-undang berkaitan

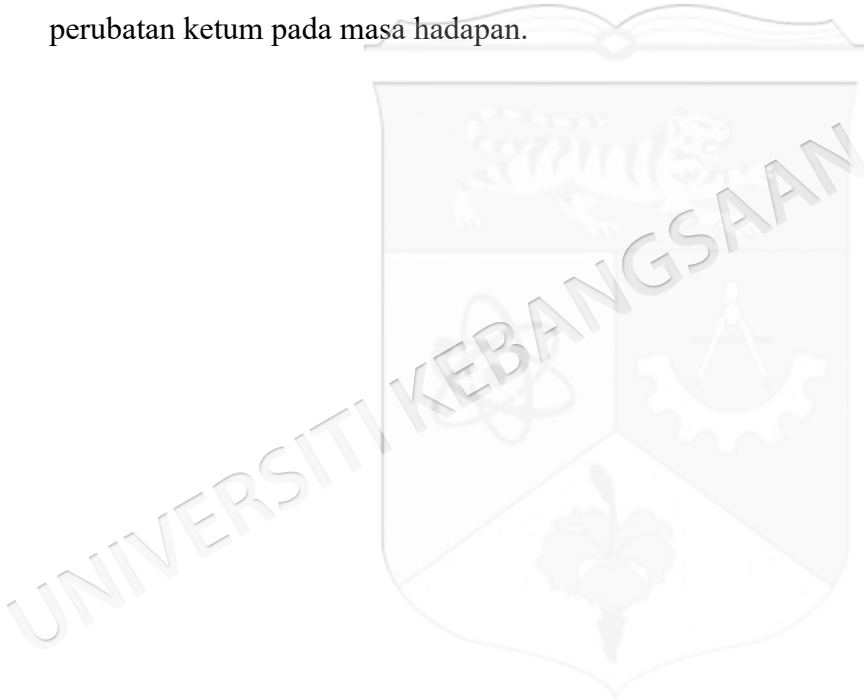
dadah narkotik diubah pada tahun 2021. Di Amerika Syarikat, ketum adalah sah dan dibenarkan sebagai suplemen pemakanan di kebanyakan negeri, tetapi setiap negeri mempunyai peraturan tersendiri. Ketiadaan garis panduan yang standard di peringkat antarabangsa menyebabkan kekeliruan dalam menguruskan pengeluaran, penggunaan, dan perdagangan ketum. Ini menghalang potensi ekonomi bagi negara-negara yang mempunyai sumber ketum seperti Malaysia. Maka, penyelidikan berkaitan ketum boleh digunakan untuk merangka peraturan yang jelas dalam mempertimbangkan penggunaan ketum yang selamat serta mengelakkan penyalahgunaan.

Selain itu, tumbuhan ketum yang dianggap sebagai pengganti morfin dalam rawatan ketagihan opioid mempunyai potensi besar untuk meningkatkan taraf sosio-ekonomi sesebuah negara. Sebagai contoh, Thailand yang merupakan negara pengeksport terbesar ketum di dunia, telah berjaya menjana ekonomi negara dan memperbaiki taraf hidup petani melalui industri ini. Di Indonesia, penggunaan domestik ketum telah diharamkan, namun negara ini masih memainkan peranan penting dalam pasaran global dengan mengeksport ketum, terutamanya ke Amerika Syarikat, yang sekaligus telah memberi impak besar kepada ekonomi tempatan. Peluang ekonomi melalui penanaman dan pengendalian ketum yang berkesan oleh petani di kawasan pedalaman membolehkan mereka memanfaatkan potensi ekonomi ketum sambil menguruskan risiko kesihatan yang berkaitan. Pembangunan industri berkaitan produk farmaseutikal atau suplemen daripada ketum boleh memberi manfaat besar kepada pendapatan negara dengan syarat terdapat pemantauan keselamatan dan keberkesanan produk. Oleh itu, dengan mengkaji semula undang-undang, Malaysia boleh mengambil inisiatif bagi memanfaatkan ketum untuk membuka peluang pekerjaan dan meningkatkan pendapatan negara melalui jualan ke pasaran antarabangsa.

Seterusnya, kesedaran awam dan pendidikan memainkan peranan penting dalam mengubah persepsi negatif terhadap ketum, yang sering dianggap sebagai bahan berbahaya. Melalui program pendidikan yang holistik, masyarakat dapat diberikan maklumat yang tepat mengenai manfaat perubatan dan ekonomi ketum, serta perbezaan antara penggunaan yang selamat dan penyalahgunaan. Dengan memperkukuhkan pemahaman ini, pandangan negatif terhadap ketum dapat diminimumkan dan masyarakat akan lebih menyokong usaha

kerajaan untuk mengawal serta memanfaatkan ketum dengan cara yang wajar. Ini akan mencipta peluang untuk menjadikan ketum sebagai sumber ekonomi yang sah dan berfaedah pada masa hadapan, terutama jika disertai dengan peraturan yang jelas dan penguatkuasaan yang cekap.

Kesimpulannya, ketum dan sebatian terbitannya mempunyai potensi untuk digunakan dalam perubatan, tetapi masih perlu banyak kajian untuk memastikan keselamatan dan keberkesanannya. Dengan pemantauan yang teliti, kerjasama antarabangsa, dan pendidikan yang baik, ketum boleh dimanfaatkan dengan mapan. Ini boleh membuka peluang ekonomi baru dan meningkatkan pengetahuan tentang manfaat perubatan ketum pada masa hadapan.



## RUJUKAN

- Abdelhameed, A.S., Bakheit, A.H., AlRabiah, H.K., Hassan, E.S.G. & Almutairi, F.M. 2019. Molecular interactions of AL3818 (anlotinib) to human serum albumin as revealed by spectroscopic and molecular docking studies. *Journal of Molecular Liquids* 273: 259–265.
- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B. & Lindahl, E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2: 19–25.
- Abubakar, M., Kandandapani, S., Mohamed, S.B., Azizah Abd Halim, A. & Tayyab, S. 2022. Shedding light on the molecular interaction between the Hepatitis B virus inhibitor, clevudine, and human serum albumin: Thermodynamic, spectroscopic, microscopic, and *in silico* analyses. *Journal of Molecular Liquids* 368: 120737.
- Abubakar, M., Mohamad, S.B., Abd Halim, A.A. & Tayyab, S. 2024. Unveiling the molecular interaction of hepatitis B virus inhibitor, entecavir with human serum albumin through computational, microscopic and spectroscopic approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* Feb 5: 1–14.
- Ahmad, I., Prabowo, W.C., Arifuddin, M., Fadraersada, J., Indriyanti, N., Herman, H., Purwoko, R.Y., Nainu, F., Rahmadi, A., Paramita, S., Kuncoro, H., Mita, N., Narsa, A.C., Prasetya, F., Ibrahim, A., Rijai, L., Alam, G., Mun'im, A. & Dej-adisai, S. 2022. *Mitragyna* species as pharmacological agents: From abuse to promising pharmaceutical products. *Life* 12(2): 193.
- Al-Harhi, S., Lachowicz, J.I., Nowakowski, M.E., Jaremko, M. & Jaremko, Ł. 2019. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 198:110716.
- AlAjmi, M.F., Rehman, M.T., Khan, R.A., Khan, M.A., Muteeb, G., Khan, M.S., Noman, O.M., Alsalme, A. & Hussain, A. 2020. Understanding the interaction between  $\alpha$ -1-acid glycoprotein (AGP) and potential Cu/Zn metallo-drugs of benzimidazole derived organic motifs: A multi-spectroscopic and molecular docking study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 225: 117457.
- Alam, M.M., Abul Qais, F., Ahmad, I., Alam, P., Hasan Khan, R. & Naseem, I. 2018. Multi-spectroscopic and molecular modelling approach to investigate the interaction of riboflavin with human serum albumin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 36(3): 795–809.
- Alves, J.E.F., Lucena, M.L.C., de Souza Lucena, A.E., das Mercedes, A.A.D., de Azevedo, R.D.S., Sousa, G.L.S., de Moura, R.O., Alves de Lima, M. do C., de Carvalho Júnior, L.B. & de Almeida, S.M.V. 2021. A simple method for obtaining human albumin and its use for *in vitro* interaction assays with indole-thiazole and indole-thiazolidinone

- derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* 192(September): 126–137.
- Anraku, M., Chuang, V.T.G., Maruyama, T. & Otagiri, M. 2013. Redox properties of serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (12): 5465–5472.
- Anwar, R., Ismail, S. & Mansor, S.M. 2012. *In vitro* effect of mitragynine on activity of drug metabolizing enzymes, N-demethylase and glutathione S-transferase in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacologyonline* 1(April 2012): 68–75.
- Ascenzi, P., Fanali, G., Fasano, M., Pallottini, V. & Trezza, V. 2014. Clinical relevance of drug binding to plasma proteins. *Journal of Molecular Structure* 1077: 4–13.
- Avery, B.A., Boddu, S.P., Sharma, A., Furr, E.B., Leon, F., Cutler, S.J. & McCurdy, C.R. 2019. Comparative pharmacokinetics of mitragynine after oral administration of *Mitragyna speciosa* (kratom) leaf extracts in rats. *Planta Medica* 85(4): 340–346.
- Ayyub, A., Saleem, M., Fatima, I., Tariq, A., Hashmi, N. & Musharraf, S.G. 2016. Glycosylated Alpha-1-acid glycoprotein 1 as a potential lung cancer serum biomarker. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 70: 68–75.
- Azizi, J., Ismail, S., Mordi, M.N., Ramanathan, S., Said, M.I.M. & Mansor, S.M. 2010. *In vitro* and *in vivo* effects of three different *Mitragyna speciosa* Korth leaf extracts on phase II drug metabolizing enzymes—glutathione transferases (GSTs). *Molecules* 15(1): 432–441.
- Bairagi, U., Mittal, P. & Mishra, B. 2015. Albumin: a versatile drug carrier. *Austin Therapeutics* 2(2): 1021.
- Bajusz, D., Rácz, A. & Héberger, K. 2017. Chemical data formats, fingerprints, and other molecular descriptions for database analysis and searching. Dlm. Chackalamannil, S., Rotella, D. & Ward, S.E. (pnyt.). *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, hlm. 329–378. Amsterdam: Elsevier.
- Bal, W., Sokołowska, M., Kurowska, E. & Faller, P. 2013. Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(12): 5444–5455.
- Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Bourdon, E. & Rondeau, P. 2012. Impaired drug-binding capacities of *in vitro* and *in vivo* glycated albumin. *Biochimie* 94(9): 1960–1967.
- Barrail-Tran, A., Mentre, F., Cosson, C., Piketty, C., Chazallon, C., Gerard, L., Girard, P.M. & Taburet, A.M. 2010. Influence of alpha-1 glycoprotein acid concentrations and variants on atazanavir pharmacokinetics in HIV-infected patients included in the ANRS 107 trial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(2): 614–619.

- Barret, R. 2018. Importance and evaluation of lipophilicity. Dlm. *Therapeutical Chemistry*, hlm. 53–78. London: Elsevier.
- Basilieri, S. & Kerrigan, S. 2020. Temperature and pH-dependent stability of *Mitragyna* alkaloids. *Journal of Analytical Toxicology* 44(4): 314–324.
- Beckett, D. 2011. Measurement and analysis of equilibrium binding titrations. Dlm. Jameson, D., Verma, M. & Westerhoff, H.V. (pnyt.). *Methods in Enzymology*, Edisi ke-1. hlm. 1–16. Maryland: Elsevier Inc.
- Beeram, S.R., Zhang, C., Suh, K., Clarke, W.A. & Hage, D.S. 2021. Characterization of drug binding with alpha1-acid glycoprotein in clinical samples using ultrafast affinity extraction. *Journal of Chromatography A* 1649(10): 462240.
- Bern, M., Sand, K.M.K., Nilsen, J., Sandlie, I. & Andersen, J.T. 2015. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery. *Journal of Controlled Release* 211: 144–162.
- Berthold, E.C., Kamble, S.H., Raju, K.S., Kuntz, M.A., Senetra, A.S., Mottinelli, M., León, F., Restrepo, L.F., Patel, A., Ho, N.P., Hiranita, T., Sharma, A., McMahon, L.R. & McCurdy, C.R. 2022. The lack of contribution of 7-hydroxymitragynine to the antinociceptive effects of mitragynine in mice: A pharmacokinetic and pharmacodynamic study. *Drug Metabolism and Disposition* 50(2): 158–167.
- Bhagavan, N.V. & Ha, C.-E. 2015. Three-dimensional structure of proteins and disorders of protein misfolding. Dlm. *Essentials of Medical Biochemistry*, Edisi ke-1. hlm. 31–51. San Diego: Elsevier.
- Bhal, S.K., Kassam, K., Peirson, I.G. & Pearl, G.M. 2007. The rule of five revisited: applying log D in place of log P in drug-likeness filters. *Molecular Pharmaceutics* 4(4): 556–560.
- Bhosle, V.K., Altit, G., Autmizguine, J. & Chemtob, S. 2017. Basic pharmacologic principles. Dlm. Polin, R.A., Abman, S.H., Rowitch, D. & Benitz, W.E. (pnyt.). *Fetal and Neonatal Physiology*, Ed. ke-5. hlm. 187–201. Amsterdam: Elsevier.
- Bi, C., Matsuda, R., Zhang, C., Isingizwe, Z., Clarke, W. & Hage, D.S. 2017. Studies of drug interactions with alpha 1 -acid glycoprotein by using on-line immunoextraction and high-performance affinity chromatography. *Journal of Chromatography A* 1519: 64–73.
- Bickerton, G.R., Paolini, G. V., Besnard, J., Muresan, S. & Hopkins, A.L. 2012. Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature Chemistry* 4(2): 90–98.
- Boffa, L., Ghè, C., Barge, A., Muccioli, G. & Cravotto, G. 2018. Alkaloid profiles and activity in different *Mitragyna speciosa* strains. *Natural Product Communications* 13(9): 1111–1116.

- Bogunia, M. & Makowski, M. 2020. Influence of ionic strength on hydrophobic interactions in water: Dependence on solute size and shape. *The Journal of Physical Chemistry B* 124(46): 10326–10336.
- Bohnert, T. & Gan, L.S. 2013. Plasma protein binding: From discovery to development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102(9): 2953–2994.
- Bonde, J., Jensen, N.M., Burgaard, P., Angelo, H.R., Graudal, N., Kampmann, J.P. & Pedersen, L.E. 1987. Displacement of lidocaine from human plasma proteins by disopyramide. *Pharmacology & Toxicology* 60(2): 151–155.
- Bortolotti, A., Wong, Y.H., Korsholm, S.S., Bahring, N.H.B., Bobone, S., Tayyab, S., van de Weert, M. & Stella, L. 2016. On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. *RSC Advances* 6(114): 112870–112876.
- Boyer, E.W., Babu, K.M., Adkins, J.E., McCurdy, C.R. & Halpern, J.H. 2008. Self-treatment of opioid withdrawal using kratom (*Mitragynia speciosa* Korth). *Addiction* 103(6): 1048–1050.
- Boyle, C.A., Coatney, R.W., Wickham, A., Mukherjee, S.K. & Meunier, L.V.D. 2021. Alpha-1 acid glycoprotein as a biomarker for subclinical illness and altered drug binding in rats. *Comparative Medicine* 71(2): 123–132.
- Brogdon, H.D., McPhee, M.M., Paine, M.F., Cox, E.J. & Burns, A.G. 2022. A case of potential pharmacokinetic kratom-drug interactions resulting in toxicity and subsequent treatment of kratom use disorder with buprenorphine/naloxone. *Journal of Addiction Medicine* 16(5): 606–609.
- Brown, P.N., Lund, J.A. & Murch, S.J. 2017. A botanical, phytochemical and ethnomedicinal review of the genus *Mitragyna* Korth: Implications for products sold as kratom. *Journal of Ethnopharmacology* 202: 302–325.
- Bteich, M. 2019. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon* 5(11): e02879.
- Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics* 126(1):1–8.
- Bulusu, G. & Desiraju, G.R. 2020. Strong and weak hydrogen bonds in protein–ligand recognition. *Journal of the Indian Institute of Science* 100(1): 31–41.
- Caridi, G., Lugani, F., Angeletti, A., Campagnoli, M., Galliano, M. & Minchiotti, L. 2022. Variations in the human serum albumin gene: molecular and functional aspects. *International Journal of Molecular Sciences* 23(3): 1159.
- Calvo, R., Carlos, R. & Erill, S. 1982. Effects of carbamylation of plasma proteins and

- competitive displacers on drug binding in uremia. *Pharmacology* 24(4): 248–252.
- Caraceni, P., Tufoni, M. & Bonavita, M.E. 2013. Clinical use of albumin. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 11 (Suppl 4): s18–25.
- Carter, D.C. & Ho, J.X. 1994. Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry* 45(10): 153–203.
- Chakraborty, M., Mitra, I., Sarkar, K., Bardhan, M., Paul, S., Basu, S., Goswami, A., Saha, A., Show, B. & Ganguly, T. 2019. Fluorescence enhancement via aggregation effect due to microenvironmental alterations in human hemoglobin protein in presence of carbon quantum dots (CQD): Comparative spectroscopic approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 215: 313–326.
- Charoenratana, S., Anukul, C. & Aramrattana, A. 2021. Attitudes towards kratom use, decriminalization and the development of a community-based Kratom control mechanism in Southern Thailand. *International Journal of Drug Policy* 95: 103197.
- Chaves, O.A., Loureiro, R.J.S., Costa-Tuna, A., Almeida, Z.L., Pina, J., Brito, R.M.M. & Serpa, C. 2023. Interaction of two commercial azobenzene food dyes, amaranth and new coccine, with human serum albumin: Biophysical characterization. *ACS Food Science and Technology* 3(5): 955–968.
- Chear, N.J.-Y., León, F., Sharma, A., Kanumuri, S.R.R., Zwolinski, G., Abboud, K.A., Singh, D., Restrepo, L.F., Patel, A., Hiranita, T., Ramanathan, S., Hampson, A.J., McMahon, L.R. & McCurdy, C.R. 2021. Exploring the chemistry of alkaloids from Malaysian *Mitragyna speciosa* (kratom) and the role of oxindoles on human opioid receptors. *Journal of Natural Products* 84(4): 1034–1043.
- Chen, C., Zhou, H., Guan, C., Zhang, H., Li, Y., Jiang, X., Dong, Z., Tao, Y., Du, J., Wang, S., Zhang, T., Du, N., Guo, J., Wu, Y., Song, Z., Luan, H., Wang, Y., Du, H., Zhang, S., Li, C., Chang, H. & Wang, T. 2020. Applicability of free drug hypothesis to drugs with good membrane permeability that are not efflux transporter substrates: A microdialysis study in rats. *Pharmacology Research and Perspectives* 8(2): 1–14.
- Chen, L., Fei, S. & Olatunji, O.J. 2022. LC/ESI/TOF-MS Characterization, anxiolytic and antidepressant-like effects of *Mitragyna speciosa* Korth extract in diabetic rats. *Molecules* 27(7): 2208.
- Chittrakarn, S., Keawpradub, N., Sawangjaroen, K., Kansanalak, S. & Janchawee, B. 2010. The neuromuscular blockade produced by pure alkaloid, mitragynine and methanol extract of kratom leaves (*Mitragyna speciosa* Korth.). *Journal of Ethnopharmacology* 129(3): 344–349.
- Cinosi, E., Martinotti, G., Simonato, P., Singh, D., Demetrovics, Z., Roman-Urrestarazu, A., Bersani, F.S., Vicknasingam, B., Piazzon, G., Li, J.-H., Yu, W.-J., Kapitány-Fövény, M., Farkas, J., Di Giannantonio, M. & Corazza, O. 2015. Following “the

- roots” of kratom (*Mitragyna speciosa*): The evolution of an enhancer from a traditional use to increase work and productivity in Southeast Asia to a recreational psychoactive drug in western countries. *BioMed Research International* 2015: 1–11.
- Curtin, N.J., Newell, D.R. & Harris, A.L. 1989. Modulation of dipyridamole action by  $\alpha$ 1 acid glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* 38(19): 3281–3288.
- D’Agostino, N., Buonanno, M., Ayoub, J., Barone, A., Monti, S.M. & Rigano, M.M. 2019. Identification of non-specific lipid transfer protein gene family members in *Solanum lycopersicum* and insights into the features of Sola 13 protein. *Scientific Reports* 9(1): 1607.
- Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 7(1): 42717.
- Damodaran, T., Chear, N.J.-Y., Murugaiyah, V., Mordi, M.N. & Ramanathan, S. 2021. Comparative toxicity assessment of kratom decoction, mitragynine and speciociliatine versus morphine on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Frontiers in Pharmacology* 12(August): 1–9.
- Damre, A.A. & Iyer, K.R. 2012. The significance and determination of plasma protein binding. Dlm. Lyubimov, A. (pnyt.). *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, hlm. 1–18. Hoboken: Wiley.
- Darden, T., York, D. & Pedersen, L. 1993. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* 98(12): 10089–10092.
- Daviter, T., Chmel, N. & Rodger, A. 2013. Circular and linear dichroism spectroscopy for the study of protein–ligand interactions. Dlm. Williams, M. A. (pnyt.). *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications, Methods in Molecular Biology*, hlm. 211–241. New York: Springer Science+Business Media New.
- De Moraes, N.V., Moretti, R.A.C., Furr, E.B., McCurdy, C.R. & Lanchote, V.L. 2009. Determination of mitragynine in rat plasma by LC–MS/MS: Application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B* 877(24): 2593–2597.
- De Simone, G., di Masi, A. & Ascenzi, P. 2021. Serum albumin: A multifaced enzyme. *International Journal of Molecular Sciences* 22(18): 10086.
- DebolinaMitra. 2020. Use of isothermal titration calorimetry to study various systems. *Materials Today: Proceedings* 23: 284–300.
- Deb, P.K., Al-Attraqchi, O., Prasad, M.R. & Tekade, R.K. 2018. Protein and tissue binding. Dlm. Tekade, K. (pnyt.). *Dosage Form Design Considerations*, hlm. 371–399. London: Elsevier.

- Dewangan, H.K. 2020. Albumin as Natural Versatile Drug Carrier for Various Diseases Treatment. Dlm. Saneja, A., Panda, A.K. & Lichtfouse, E. (pnyt.). *Sustainable Agriculture Reviews 43: Pharmaceutical Technology for Natural Products Delivery Vol. 1 Fundamentals and Applications*, hlm. 239–268. Cham: Springer.
- Dobrynin, S., Kutseikin, S., Morozov, D., Krumkacheva, O., Spitsyna, A., Gatilov, Y., Silnikov, V., Angelovski, G., Bowman, M.K., Kirilyuk, I. & Chubarov, A. 2020. Human serum albumin labelled with sterically-hindered nitroxides as potential MRI contrast agents. *Molecules* 25(7): 1709.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.L., Ai, S.M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.L. & Liu, S.Q. 2016. Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences* 17(2): 1–34.
- Dubey, R.K., Leeners, B., Imthurn, B., Merki-Feld, G.S. & Rosselli, M. 2017. Piperine decreases binding of drugs to human plasma and increases uptake by brain microvascular endothelial cells. *Phytotherapy Research* 31(12): 1868–1874.
- Dubey, S., Kallubai, M., Sarkar, A. & Subramanyam, R. 2018. Elucidating the active interaction mechanism of phytochemicals withanolide and withanoside derivatives with human serum albumin. *PLoS ONE* 13(11): 1–17.
- Dufrêne, Y.F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Gerber, C. & Müller, D.J. 2017. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology* 12(4): 295–307.
- Eckenhoff, R.G., Petersen, C.E., Ha, C.-E. & Bhagavan, N. V. 2000. Inhaled anesthetic binding sites in human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry* 275(39): 30439–30444.
- Eisenman, S. W. 2015. The botany of *Mitragyna speciosa* (Korth) Havil. and related species. Dlm. Raffa, R. B. (pnyt.). *Kratom and Other Mitragynines: The Chemistry and Pharmacology of Opioids from a Non-Opium Source*. hlm. 57–76. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Ellis, C.R., Racz, R., Kruhlak, N.L., Kim, M.T., Zakharov, A. V., Southall, N., Hawkins, E.G., Burkhart, K., Strauss, D.G. & Stavitskaya, L. 2020. Evaluating kratom alkaloids using PHASE. *PLoS ONE* 15(3): e0229646.
- Elsadek, B. & Kratz, F. 2012. Impact of albumin on drug delivery – New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release* 157(1): 4–28.
- Ezike, T.C., Okpala, U.S., Onoja, U.L., Nwike, C.P., Ezeako, E.C., Okpara, O.J., Okoroafor, C.C., Eze, S.C., Kalu, O.L., Odoh, E.C., Nwadike, U.G., Ogbodo, J.O., Umeh, B.U., Ossai, E.C. & Nwanguma, B.C. 2023. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon* 9(6): e17488.

- Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M. & Ascenzi, P. 2012. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* 33(3): 209–290.
- Farah Idayu, N., Taufik Hidayat, M., Moklas, M.A.M., Sharida, F., Nurul Raudzah, A.R., Shamima, A.R. & Apryani, E. 2011. Antidepressant-like effect of mitragynine isolated from *Mitragyna speciosa* Korth in mice model of depression. *Phytomedicine* 18(5): 402–407.
- Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S. & Ascenzi, P. 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* 57(12): 787–796.
- Fernandes, C.L., Ligabue-Braun, R. & Verli, H. 2015. Structural glycobiology of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and its implications for pharmacokinetics and inflammation. *Glycobiology* 25(10): 1125–1133.
- Ferrell, B.R. & Jackson, K.C. 1999. An introduction of hydrogen bonding. *Journal of Pharmaceutical Care in Pain & Symptom Control* 7(3): 83–86.
- Filip, Z., Jan, K., Vendula, S., Jana, K.Z., Kamil, M. & Kamil, K. 2013. Albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: old acquaintances. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 9(8): 943–954.
- Fitos, I., Simon, Á., Zsila, F., Mády, G., Bencsura, Á., Varga, Z., Örfi, L., Kéri, G. & Visy, J. 2012. Characterization of binding mode of imatinib to human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *International Journal of Biological Macromolecules* 50(3): 788–795.
- Fonin, A. V., Sulatskaya, A.I., Kuznetsova, I.M. & Turoverov, K.K. 2014. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction. *PloS ONE* 9(7): e103878.
- Fournier, T., Medjoubi-N, N. & Porquet, D. 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482(1–2): 157–171.
- Freyer, M.W. & Lewis, E.A. 2008. Isothermal titration calorimetry: Experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods in Cell Biology* 84(07): 79–113.
- Fu, H., Cid, F., Dworkin, N., Cocores, J. & Shore, G. 2015. Screening and Identification of Mitragynine and 7-hydroxymitragynine in human urine by LC-MS/MS. *Chromatography* 2(2): 253–264.
- Gambacorti-Passerini, C., Zucchetti, M., Russo, D., Frapolli, R., Verga, M., Bungaro, S., Tornaghi, L., Rossi, F., Pioltelli, P., Pogliani, E., Alberti, D., Corneo, G. & D'Incalci, M. 2003. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters

- its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clinical Cancer Research* 9(2): 625–632.
- Gao, Y., Gesenberg, C. & Zheng, W. 2017. Oral formulations for preclinical studies. Dlm. Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., Yu, L. & Liu, R. (pnyt.). *Developing Solid Oral Dosage Forms*, hlm. 455–495. New York: Elsevier.
- Gaohua, L., Miao, X. & Dou, L. 2021. Crosstalk of physiological pH and chemical pKa under the umbrella of physiologically based pharmacokinetic modeling of drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 17(9): 1103–1124.
- Garcia-Romeu, A., Cox, D.J., Smith, K.E., Dunn, K.E. & Griffiths, R.R. 2020. Kratom (*Mitragyna speciosa*): User demographics, use patterns, and implications for the opioid epidemic. *Drug and Alcohol Dependence* 208(July 2019): 107849.
- Gemelli, C., Martello, A., Montanari, M., Zanocco Marani, T., Salsi, V., Zappavigna, V., Parenti, S., Vignudelli, T., Selmi, T., Ferrari, S. & Grande, A. 2013. The orosomucoid 1 protein is involved in the vitamin D – mediated macrophage de-activation process. *Experimental Cell Research* 319(20): 3201–3213.
- Ghobadi, S., Ashrafi-Kooshk, M.R., Mahdjuni, H. & Khodarahmi, R. 2018. Enhancement of intrinsic fluorescence of human carbonic anhydrase II upon topiramate binding: Some evidence for drug-induced molecular contraction of the protein. *International Journal of Biological Macromolecules* 108: 240–249.
- Gholam, G.M., Darmawan, N.I., Siregar, J.E. & Artika, I.M. 2022. Selected polyphenols from date (*Phoenix dactylifera*) as Anti-Virulence of *Candida albicans* through multiple enzyme targets. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 13(4):386.
- Ghuman, J., Zunszain, P.A., Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Otagiri, M. & Curry, S. 2005. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology* 353(1): 38–52.
- Goh, Y.S., Karunakaran, T., Murugaiyah, V., Santhanam, R., Hafizi, M., Bakar, A. & Ramanathan, S. 2021. Accelerated solvent extractions (ASE) of *Mitragyna speciosa* Korth. (kratom) leaves: Evaluation of its cytotoxicity and antinociceptive activity. *Molecules* 26(12): 3704.
- Goolkasian, D.L., Slaughter, R.L., Edwards, D.J. & Lalka, D. 1983. Displacement of lidocaine from serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein binding sites by basic drugs. *European Journal of Clinical Pharmacology* 25(3): 413–417.
- Goncharova, I., Orlov, S. & Urbanová, M. 2013. The location of the high- and low-affinity bilirubin-binding sites on serum albumin: Ligand-competition analysis investigated by circular dichroism. *Biophysical Chemistry* 180–181: 55–65.

- Greenfield, N.J. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* 1(6): 2876–2890.
- Grundmann, O. 2017. Patterns of Kratom use and health impact in the US—Results from an online survey. *Drug and Alcohol Dependence* 176: 63–70.
- Grundmann, O., Hendrickson, R.G. & Greenberg, M.I. 2022. Kratom: History, pharmacology, current user trends, adverse health effects and potential benefits. *Disease-a-Month* (Jun): 101442.
- Gugler, R. & Azarnoff, D.L. 1976. Drug protein binding and the nephrotic syndrome. *Clinical Pharmacokinetics* 1(1): 25–35.
- Ha, C.-E. & Bhagavan, N. V. 2013. Novel insights into the pleiotropic effects of human serum albumin in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(12): 5486–5493.
- Halpenny, G.M. 2017. *Mitragyna speciosa*: Balancing potential medical benefits and abuse. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 8(9): 897–899.
- Hanada, K. 2017. Lipophilicity influences drug binding to  $\alpha$ 1-acid glycoprotein F1/S variants but not to the a variant. *Drugs in R and D* 17(3): 475–480.
- Hanapi, N., Ismail, S. & Mansor, S. 2013. Inhibitory effect of mitragynine on human cytochrome P450 enzyme activities. *Pharmacognosy Research* 5(4): 241.
- Hann, E., Malagu, K., Stott, A. & Vater, H. 2022. The importance of plasma protein and tissue binding in a drug discovery program to successfully deliver a preclinical candidate. Dlm. Witty, D.R. & Cox, B. (pnyt.). *Progress in Medicinal Chemistry*, hlm. 163–214. Amsterdam: Elsevier.
- Haraldsson, B. & Rippe, B. 1987. Orosomuroid as one of the serum components contributing to normal capillary permselectivity in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 129(1): 127–135.
- Harizal, S.N., Mansor, S.M., Hasnan, J., Tharakan, J.K.J. & Abdullah, J. 2010. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in rodent. *Journal of Ethnopharmacology* 131(2): 404–409.
- Haron, M. & Ismail, S. 2015. Effects of mitragynine and 7-hydroxymitragynine (the alkaloids of *Mitragyna speciosa* Korth) on 4-methylumbelliferone glucuronidation in rat and human liver microsomes and recombinant human uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase isoforms. *Pharmacognosy Research* 7(4): 341.
- Hassan, Z., Muzaimi, M., Navaratnam, V., Yusoff, N.H.M., Suhaimi, F.W., Vadivelu, R., Vicknasingam, B.K., Amato, D., von Hörsten, S., Ismail, N.I.W., Jayabalan, N., Hazim, A.I., Mansor, S.M. & Müller, C.P. 2013. From kratom to mitragynine and its

- derivatives: Physiological and behavioural effects related to use, abuse, and addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37(2): 138–151.
- Hazim, A.I., Ramanathan, S., Parthasarathy, S., Muzaimi, M. & Mansor, S.M. 2014. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. *The Journal of Physiological Sciences* 64(3): 161–169.
- Hemby, S.E., McIntosh, S., Leon, F., Cutler, S.J. & McCurdy, C.R. 2019. Abuse liability and therapeutic potential of the *Mitragyna speciosa* (kratom) alkaloids mitragynine and 7-hydroxymitragynine. *Addiction Biology* 24(5): 874–885.
- Henningfield, J.E., Fant, R. V. & Wang, D.W. 2018. The abuse potential of kratom according to the 8 factors of the controlled substances act: implications for regulation and research. *Psychopharmacology* 235(2): 573–589.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C. & Fraaije, J.G.E.M. 1997. LINCOS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* 18(12): 1463–1472.
- Hiranita, T., Sharma, A., Oyola, F.L., Obeng, S., Reeves, M.E., Restrepo, L.F., Patel, A., Behnke, M., Ho, N.P., Williamson, M.R., Gamez Jimenez, L.R., McCurdy, C.R. & McMahan, L.R. 2020. Potential contribution of 7-hydroxymitragynine, a metabolite of the primary kratom (*Mitragyna speciosa*) alkaloid mitragynine, to the  $\mu$ -opioid activity of mitragynine in rats. *The FASEB Journal* 34 (S1): 1–1.
- Hochepped, T., Berger, F.G., Baumann, H. & Libert, C. 2003.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14(1): 25–34.
- Hochepped, T., Van Molle, W., Berger, F.G., Baumann, H. & Libert, C. 2000. Involvement of the acute phase protein  $\alpha$ 1 -acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *Journal of Biological Chemistry* 275(20): 14903–14909.
- Holler, J.M., Vorce, S.P., McDonough-Bender, P.C., Magluilo, J., Solomon, C.J. & Levine, B. 2011. A drug toxicity death involving propylhexedrine and mitragynine\*. *Journal of Analytical Toxicology* 35(1): 54–59.
- Hossain, R., Sultana, A., Nuinon, M., Noonong, K., Tangpong, J., Hossain, K.H. & Rahman, M.A. 2023. A critical review of the neuropharmacological effects of kratom: an insight from the functional array of identified natural compounds. *Molecules* 28(21): 7372.
- Houghton, P.J., Latiff, A. & Said, I.M. 1991. Alkaloids from *Mitragyna speciosa*. *Phytochemistry* 30(1): 347–350.
- Howard, M., Hill, J., Galluppi, G. & McLean, M. 2010. Plasma protein binding in drug discovery and development. *Combinatorial Chemistry and High Throughput*

*Screening* 13(2): 170–187.

Hsiao, S.-Y., Lai, Y.-R., Kung, C.-T., Tsai, N.-W., Su, C.-M., Huang, C.-C., Wang, H.-C., Cheng, B.-C., Su, Y.-J., Lin, W.-C., Chiang, Y.-F., Ko, J.-Y. & Lu, C.-H. 2019.  $\alpha$ -1-Acid glycoprotein concentration as an outcome predictor in adult patients with sepsis. *BioMed Research International* 2019: 1–9.

Hu, Z.-Y., Sui, H.-Y., Zhong, Q.-F., Hu, L., Shi, J.-H., Jiang, S.-L. & Han, L. 2024. In vitro investigation of the binding characteristics of dacomitinib to human  $\alpha$  1-acid glycoprotein: Multispectral and computational modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 314(March): 124197.

Huang, J.X., Cooper, M.A., Baker, M.A., Azad, M.A.K., Nation, R.L., Li, J. & Velkov, T. 2012. Drug-binding energetics of human  $\alpha$ -1-acid glycoprotein assessed by isothermal titration calorimetry and molecular docking simulations. *Journal of Molecular Recognition* 25(12): 642–656.

Huang, Z. & Ung, T. 2013. Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Current Drug Metabolism* 14(2): 226–238.

Ishay, R. Ben, Israel, L.L., Eitan, E.L., Partouche, D.M. & Lellouche, J.-P. 2016. Maghemite-human serum albumin hybrid nanoparticles: towards a theranostic system with high MRI  $r_2^*$  relaxivity. *Journal of Materials Chemistry B* 4(21): 3801–3814.

Itoh, T., Nakashima, K., Tsuda, Y. & Yamada, H. 1996. Stereoselective binding of carbenicillin epimers to human serum albumin. *Chirality* 8(2): 201–206.

Israili, Z.H. & Dayton, P.G. 2001. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs †, ‡. *Drug Metabolism Reviews* 33(2): 161–235.

Jagabalan, J.D.Y., Murugaiyah, V., Zainal, H., Mansor, S.M. & Ramanathan, S. 2018. Intestinal permeability of mitragynine in rats using in situ absorption model. *Journal of Asian Natural Products Research* 21(4): 351–363.

Janchawee, B., Keawpradub, N., Chittrakarn, S., Prasetho, S., Wararatananurak, P. & Sawangjareon, K. 2007. A high-performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography* 21(2): 176–183.

Jiang, S.-L., Li, L., Hu, L., Kou, S.-B. & Shi, J.-H. 2023. Comprehending binding features between ibrutinib and Human Alpha-1 acid glycoprotein: Combined experimental approaches and theoretical simulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 285(July 2022): 121834.

Jiang, S.-L., Wang, W.-J., Hu, Z.-Y., Zhang, R.-J. & Shi, J.-H. 2024. Comprehending the intermolecular interaction of JAK inhibitor fedratinib with bovine serum albumin (BSA)/human alpha-1-acid glycoprotein (HAG): Multispectral methodologies and

molecular simulation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 304(August 2023): 123277.

Kamble, S.H., Berthold, E.C., King, T.I., Raju Kanumuri, S.R., Popa, R., Herting, J.R., León, F., Sharma, A., McMahon, L.R., Avery, B.A. & McCurdy, C.R. 2021. Pharmacokinetics of eleven kratom alkaloids following an oral dose of either traditional or commercial kratom products in rats. *Journal of Natural Products* 84(4): 1104–1112.

Kamble, S.H., Sharma, A., King, T.I., Berthold, E.C., León, F., Meyer, P.K.L., Kanumuri, S.R.R., McMahon, L.R., McCurdy, C.R. & Avery, B.A. 2020a. Exploration of cytochrome P450 inhibition mediated drug-drug interaction potential of kratom alkaloids. *Toxicology Letters* 319: 148–154.

Kamble, S.H., León, F., King, T.I., Berthold, E.C., Lopera-Londono, C., Siva Rama Raju, K., Hampson, A.J., Sharma, A., Avery, B.A., McMahon, L.R. & McCurdy, C.R. 2020b. Metabolism of a kratom alkaloid metabolite in human plasma increases its opioid potency and efficacy. *ACS Pharmacology and Translational Science* 3(6): 1063–1068.

Kamble, S.H., Sharma, A., King, T.I., León, F., McCurdy, C.R. & Avery, B.A. 2019. Metabolite profiling and identification of enzymes responsible for the metabolism of mitragynine, the major alkaloid of *Mitragyna speciosa* (kratom). *Xenobiotica* 49(11): 1279–1288.

Kandandapani, S., Kabir, M.Z., Ridzwan, N.F.W., Mohamad, S.B. & Tayyab, S. 2022. Biomolecular interaction mechanism of an anticancer drug, pazopanib with human serum albumin: a multi-spectroscopic and computational approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 40(18): 8312–8323.

Kapp, F.G., Maurer, H.H., Auwärter, V., Winkelmann, M. & Hermanns-Clausen, M. 2011. Intrahepatic cholestasis following abuse of powdered kratom (*Mitragyna speciosa*). *Journal of Medical Toxicology* 7(3): 227–231.

Karunakaran, T., Ganasan, J., Rusmadi, N.N., Santhanam, R. & Mordi, M.N. 2024. *In-vitro* hepatotoxic activity of mitragynine and paynantheine isolated from the leaves of *Mitragyna speciosa* Korth. (kratom). *Natural Product Research* Jul 9: 1–5.

Karunakaran, T., Ngew, K.Z., Zailan, A.A.D., Mian Jong, V.Y. & Abu Bakar, M.H. 2022. The chemical and pharmacological properties of mitragynine and its diastereomers: an insight review. *Frontiers in Pharmacology* 13(February): 1–11.

Kawase, A., Ikuta, H., Uno, S., Yamamoto, K., Akitsu, N., Nagao, T. & Iwaki, M. 2013. Alteration in plasma protein binding properties of propranolol and flurbiprofen during development of adjuvant-induced arthritis in rats. *Xenobiotica* 43(3): 246–252.

Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C. 2005. How to study proteins by circular dichroism.

*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1751(2): 119–139.

- Kenmotsu, H., Imamura, C.K., Ono, A., Omori, S., Nakashima, K., Wakuda, K., Taira, T., Naito, T., Murakami, H., Takahashi, T. & Tanigawara, Y. 2017. The effects of advanced age and serum  $\alpha$  1 -acid glycoprotein on docetaxel unbound exposure and dose-limiting toxicity in cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83(11): 2416–2425.
- Khaldan, A., Bouamrane, S., El-mernissi, R., Alaqrbeh, M., Hajji, H., Alsakhen, N., Maghat, H., Ajana, M.A., Sbai, A., Bouachrine, M. & Lakhlifi, T. 2022. Computational study of quinoline-based thiazazole compounds as potential antileishmanial inhibitors. *New Journal of Chemistry* 46(36): 17554–17576.
- Kharazian, B., Ahmad, A.A. & Mabudi, A. 2021. A molecular dynamics study on the binding of gemcitabine to human serum albumin. *Journal of Molecular Liquids* 337: 116496.
- Khastar, H., Foroughi, K., Aghayan, S.S., Yarmohammadi, M. & Jafarisani, M. 2020. Molecular docking and binding interaction between psychedelic drugs and human serum albumin. *BioTechnologia* 101(2): 109–116.
- Kiselev, M.A., Gryzunov, M.A., Dobretsov, G.E. & Komarova, M.N. 2001. Size of a human serum albumin molecule in solution. *Biofizika* 46 : 423–427.
- Kitajima, M., Misawa, K., Kogure, N., Said, I.M., Horie, S., Hatori, Y., Murayama, T. & Takayama, H. 2006. A new indole alkaloid, 7-hydroxyspeciociliatine, from the fruits of Malaysian *Mitragyna speciosa* and its opioid agonistic activity. *Journal of Natural Medicines* 60(1): 28–35.
- Klammt, S., Mitzner, S.R., Stange, J., Loock, J., Heemann, U., Emmrich, J., Reisinger, E.C. & Schmidt, R. 2008. Improvement of impaired albumin binding capacity in acute-on-chronic liver failure by albumin dialysis. *Liver Transplantation* 14(9): 1333–1339.
- Kober, A., Jenner, Å., Sjöholm, I., Borgå, O. & Odar-Cederlöf, I. 1978. Differentiated effects of liver cirrhosis on the albumin binding sites for diazepam, salicylic acid and warfarin. *Biochemical Pharmacology* 27(23): 2729–2735.
- Komori, H., Watanabe, H., Shuto, T., Kodama, A., Maeda, H., Watanabe, K., Kai, H., Otagiri, M. & Maruyama, T. 2012.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway. *Journal of Biological Chemistry* 287(36): 30688–30700.
- Kong, W.M., Mohamed, Z., Alshawsh, M.A. & Chik, Z. 2017a. Evaluation of pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability of mitragynine using *in vivo* microdialysis technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 143: 43–47.

- Kong, W.M., Chik, Z., Mohamed, Z. & Alshawsh, M.A. 2017b. Physicochemical characterization of *Mitragyna speciosa* alkaloid extract and mitragynine using *in vitro* high throughput assays. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 20: 796–803.
- Kopecký, V., Ettrich, R., Hofbauerová, K. & Baumruk, V. 2003. Structure of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300(1): 41–46.
- Kragh-hansen, U. 1985. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. *Biochemical Journal* 225(3): 629–638.
- Kragh-Hansen, U. 2013. Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin–ligand complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(12): 5535–5544.
- Kragh-Hansen, U. 2016. Human serum albumin: a multifunctional protein. Dlm. Otagiri, M. & Chuang, V. (pnyt.). *Albumin in Medicine*, hlm 1–24. Singapore: Springer.
- Kragh-Hansen, U., Chuang, V.T.G. & Otagiri, M. 2002. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25(6): 695–704.
- Kragh-hansen, U. 1983. Relations between high-affinity binding sites for L-tryptophan , diazepam , salicylate and phenol red on human serum albumin. *Biochemical Journal* 209(1): 135–142.
- Kronstrand, R., Roman, M., Thelander, G. & Eriksson, A. 2011. Unintentional fatal intoxications with mitragynine and o-desmethyiltramadol from the herbal blend krypton. *Journal of Analytical Toxicology* 35(4): 242–247.
- Kruegel, A.C., Gassaway, M.M., Kapoor, A., Váradi, A., Majumdar, S., Filizola, M., Javitch, J.A. & Sames, D. 2016. Synthetic and receptor signaling explorations of the *Mitragyna* Alkaloids: Mitragynine as an atypical molecular framework for opioid receptor modulators. *Journal of the American Chemical Society* 138(21): 6754–6764.
- Kruegel, A.C., Uprety, R., Grinnell, S.G., Langreck, C., Pekarskaya, E.A., Le Rouzic, V., Ansonoff, M., Gassaway, M.M., Pintar, J.E., Pasternak, G.W., Javitch, J.A., Majumdar, S. & Sames, D. 2019. 7-Hydroxymitragynine Is an active metabolite of mitragynine and a key mediator of its analgesic effects. *ACS Central Science* 5(6): 992–1001.
- Kumarnsit, E., Keawpradub, N., Sengnon, N., Wungsintaweekul, J. & Cheaha, D. 2021. Anorectic effect, biochemical and hematological profiles of alkaloid extract from *Mitragyna speciosa* Korth. in rats. *Sains Malaysiana* 50(3): 779–790.
- Lakowicz, J.R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Ed. ke-3. New York:

Springer.

- Landin, E.J.B., Williams, C., Ryan, S.A., Bochel, A., Akter, N., Redfield, C., Sessions, R.B., Dedi, N., Taylor, R.J. & Crump, M.P. 2021. The structural basis for high affinity binding of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein to the potent antitumor compound UCN-01. *Journal of Biological Chemistry* 297(6): 101392.
- Lapins, M., Arvidsson, S., Lampa, S., Berg, A., Schaal, W., Alvarsson, J. & Spjuth, O. 2018. A confidence predictor for logD using conformal regression and a support-vector machine. *Journal of Cheminformatics* 10(1): 17.
- Larsen, M.T., Kuhlmann, M., Hvam, M.L. & Howard, K.A. 2016. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Molecular and Cellular Therapies* 4(1): 3.
- León, F., Habib, E., Adkins, J.E., Furr, E.B., McCurdy, C.R. & Cutler, S.J. 2009. Phytochemical characterization of the leaves of *Mitragyna Speciosa* grown in USA. *Natural Product Communications* 4(7): 907–910.
- León, F., Obeng, S., Mottinelli, M., Chen, Y., King, T.I., Berthold, E.C., Kamble, S.H., Restrepo, L.F., Patel, A., Gamez-Jimenez, L.R., Lopera-Londoño, C., Hiranita, T., Sharma, A., Hampson, A.J., Canal, C.E., McMahan, L.R. & McCurdy, C.R. 2021. Activity of *Mitragyna speciosa* (“kratom”) alkaloids at serotonin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 64(18): 13510–13523.
- Ling, I., Taha, M., Al-Sharji, N.A. & Abou-Zied, O.K. 2018. Selective binding of pyrene in subdomain IB of human serum albumin: Combining energy transfer spectroscopy and molecular modelling to understand protein binding flexibility. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 194: 36–44.
- Lim, E.L., Seah, T.C., Koe, X.F., Wahab, H.A., Adenan, M.I., Jamil, M.F.A., Majid, M.I.A. & Tan, M.L. 2013. *In vitro* evaluation of cytochrome P450 induction and the inhibition potential of mitragynine, a stimulant alkaloid. *Toxicology In Vitro* 27(2): 812–824.
- Linhares, L.A. & Ramos, C.H.I. 2023. Unlocking insights into folding, structure, and function of proteins through circular dichroism spectroscopy—A short review. *Applied Biosciences* 2(4): 639–655.
- Lipinski, C.A. 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* 1(4): 337–341.
- Liu, Q.-H., Zhang, Q., Zhang, R.-J., Jiang, S.-L. & Shi, J.-H. 2024. Insights on the in-vitro binding characteristics of human  $\alpha$ -1-acid glycoprotein (HAG) with JAK inhibitor ocalcitinib: Multi-spectroscopic analysis combined with theoretical calculations. *Journal of Molecular Structure* 1310(March): 138136.
- Lobanov, M.Y., Bogatyreva, N.S. & Galzitskaya, O. V. 2008. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology* 42(4): 623–628.

- Loftsson, T. 2015. Basic concepts of pharmacokinetics. Dlm. *Essential Pharmacokinetics*, hlm. 9–84. Cambridge: Elsevier.
- Lovering, E.G. & Black, D.B. 1974. Drug permeation through membranes III: Effect of pH and various substances on permeation of phenylbutazone through everted rat intestine and polydimethylsiloxane. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63(5): 671–676.
- Luo, Z., Lei, H., Sun, Y., Liu, X. & Su, D.F. 2015. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. *Journal of Physiology and Biochemistry* 71(2): 329–340.
- Lupidi, G., Scire, A., Camaioni, E., Khalife, K.H., De Sanctis, G., Tanfani, F. & Damiani, E. 2010. Thymoquinone, a potential therapeutic agent of *Nigella sativa*, binds to site I of human serum albumin. *Phytomedicine* 17(10): 714–720.
- Lynch, N., Lima, J.D., Spinieli, R.L. & Kaur, S. 2023. Opioids, sleep, analgesia and respiratory depression: Their convergence on Mu ( $\mu$ )-opioid receptors in the parabrachial area. *Frontiers in Neuroscience* 17(April): 1–8.
- Ma, H., Yang, X., Ke, J., Wang, C., Peng, L., Hu, F. & Yuan, H. 2020. Smart assembled human serum albumin nanocarrier enhanced breast cancer treatment and antitumor immunity by chemo-photothermal therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 6(5): 3217–3229.
- Maciążek-Jurczyk, M., Janas, K., Pożycka, J., Szkudlarek, A., Rogóż, W., Owczarzy, A. & Kulig, K. 2020. Human serum albumin aggregation/fibrillation and its abilities to drugs binding. *Molecules* 25(3): 618.
- Maeda, H., Morinaga, T., Mori, I. & Nishi, K. 1984. Further characterization of the effects of alpha-1-acid glycoprotein on the passage of human erythrocytes through micropores. *Cell Structure and Function* 9(3): 279–290.
- Mammadova, A., Mermer, A. & Kocabaş, F. 2021. Screening of the small molecule library of Meinox enables the identification of anticancer compounds in pathologically distinct cancers. *Turkish Journal of Biology* 45(5): 633–643.
- Man, W.H., Wilting, I., Heerdink, E.R., Hugenholtz, G.W.K., Bognár, T., ten Berg, M.J., van Solinge, W.W., Egberts, T.A.C.G. & van Maarseveen, E.M. 2019. Unbound fraction of clozapine significantly decreases with elevated plasma concentrations of the inflammatory acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein. *Clinical Pharmacokinetics* 58(8): 1069–1075.
- Manda, V., Avula, B., Ali, Z., Khan, I., Walker, L. & Khan, S. 2014. Evaluation of *in vitro* absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) properties of mitragynine, 7-hydroxymitragynine, and mitraphylline. *Planta Medica* 80(07): 568–576.

- Manda, V.K., Avula, B., Dale, O.R., Ali, Z., Khan, I.A., Walker, L.A. & Khan, S.I. 2017. PXR mediated induction of CYP3A4, CYP1A2, and P-gp by *Mitragyna speciosa* and its alkaloids. *Phytotherapy Research* 31(12): 1935–1945.
- Mantri, R. V., Sanghvi, R. & Zhu, H.J. 2017. Solubility of pharmaceutical solids. Dlm. Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., Yu, L. & Liu, R. (pnyt.). *Developing Solid Oral Dosage Forms*, Ed. ke-2. hlm. 3–22. New York: Elsevier.
- Martínez-Gómez, M.A., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M. & Medina-Hernández, M.J. 2006. Characterization of basic drug–human serum protein interactions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 27(17): 3410–3419.
- Matsumoto, K., Hatori, Y., Murayama, T., Tashima, K., Wongseripipatana, S., Misawa, K., Kitajima, M., Takayama, H. & Horie, S. 2006. Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociception and inhibition of gastrointestinal transit induced by 7-hydroxymitragynine, isolated from Thai herbal medicine *Mitragyna speciosa*. *European Journal of Pharmacology* 549(1–3): 63–70.
- Matsumoto, K., Horie, S., Ishikawa, H., Takayama, H., Aimi, N., Ponglux, D. & Watanabe, K. 2004. Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life Sciences* 74(17): 2143–2155.
- Matsumoto, K., Horie, S., Takayama, H., Ishikawa, H., Aimi, N., Ponglux, D., Murayama, T. & Watanabe, K. 2005. Antinociception, tolerance and withdrawal symptoms induced by 7-hydroxymitragynine, an alkaloid from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life Sciences* 78(1): 2–7.
- Matsumoto, K., Nishi, K., Tokutomi, Y., Irie, T., Suenaga, A. & Otagiri, M. 2003. Effects of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein on erythrocyte deformability and membrane stabilization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26(1): 123–126.
- Maxwell, E.A., King, T.I., Kamble, S.H., Raju, K.S.R., Berthold, E.C., León, F., Avery, B.A., McMahon, L.R., McCurdy, C.R. & Sharma, A. 2020. Pharmacokinetics and safety of mitragynine in beagle dogs. *Planta Medica* 86(17): 1278–1285.
- Meepong, R. & Sooksawate, T. 2019. Mitragynine reduced morphine-induced conditioned place preference and withdrawal in rodents. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 43(1): 21–29.
- Meireles, V., Rosado, T., Barroso, M., Soares, S., Gonçalves, J., Luís, Â., Caramelo, D., Simão, A., Fernández, N., Duarte, A. & Gallardo, E. 2019. *Mitragyna speciosa*: Clinical, toxicological aspects and analysis in biological and non-biological samples. *Medicines* 6(1): 35.
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. & Cui, M. 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*

7(2): 146–157.

- Mera, K., Anraku, M., Kitamura, K., Nakajou, K., Maruyama, T. & Otagiri, M. 2005. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334(4): 1322–1328.
- Mestriner, F., Francisco, D.F., Campos, L.C.B., Couto, A.E.S., Fraga-Silva, T.F.C., Flora Dugaich, V., D Avila-Mesquita, C., Zukowski Kovacs, H., Vasconcelos, J.L., Milani, E.R., Santos Guedes de Sá, K., Martins, R., Jordani, M.C., Corsi, C.A.C., Barbosa, J.M., Vasconcelos, T., Gonçalves Meneguetti, M., Neto, J., da Costa, R.M., Evora, P.R.B., Arruda, E., Tostes, R., Polonis, K., Bonato, V.L.D., Auxiliadora-Martins, M., Ribeiro, M.S. & Becari, C. 2024. Alpha 1-acid glycoprotein is upregulated in severe COVID-19 patients and decreases neutrophil NETs in SARS-CoV-2 infection. *Cytokine* 176: 156503.
- Mestriner, F.L.A.C., Spiller, F., Laure, H.J., Souto, F.O., Rosa, J.C., Ferreira, S.H., Greene, L.J. & Cunha, F.Q. 2007. Acute-phase protein  $\alpha$ -1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(49): 19595–19600.
- Meyer, M.R., Wagmann, L., Schneider-Daum, N., Loretz, B., de Souza Carvalho, C., Lehr, C.-M. & Maurer, H.H. 2015. P-glycoprotein interactions of novel psychoactive substances – Stimulation of ATP consumption and transport across Caco-2 monolayers. *Biochemical Pharmacology* 94(3): 220–226.
- Miconai, A., Moussong, É., Wien, F., Boros, E., Vadászi, H., Murvai, N., Lee, Y., Molnár, T., Réfrégiérs, M., Goto, Y., Tantos, Á. & Kardos, J. 2022. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Research* 50(W1): W90–W98.
- Miles, A.J., Janes, R.W. & Wallace, B.A. 2021. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: A tutorial review. *Chemical Society Reviews* 50(15): 8400–8413.
- Mkhayar, K., Daoui, O., Elkhatabi, S., Chtita, S. & Elkhlabi, R. 2023. QSAR study and molecular docking assisted design of novel cyclohexane- 1,3-dione derivatives as anticancer agents for non-small cell lung cancer. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 13(6): 524.
- Moklas, M.A.M., Suliman, N.A., Mat Taib, C.N. & Baharuldin, M.T.H. 2013. Sedative, cognitive impairment and anxiolytic effects of acute *Mitragyna Speciosa* in rodents. *Journal of US-China Medical Science* 10(1): 37–44.
- Moosavi-Movahedi, Z., Safarian, S., Zahedi, M., Sadeghi, M., Saboury, A.A., Chamani, J., Bahrami, H., Ashraf-Modarres, A. & Moosavi-Movahedi, A.A. 2006. Calorimetric and binding dissections of HSA upon interaction with bilirubin. *The Protein Journal*

25(3): 193–201.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. & Olson, A.J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30(16): 2785–2791.

Mothes, E. & Faller, P. 2007. Evidence that the principal Co<sup>II</sup>-Binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. *Biochemistry* 46(8): 2267–2274

Mrkalić, E., Jelić, R., Stojanović, S. & Sovrlić, M. 2021. Interaction between olanzapine and human serum albumin and effect of metal ions, caffeine and flavonoids on the binding: A spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 249: 119295.

Müller, D.J., Dumitru, A.C., Lo Giudice, C., Gaub, H.E., Hinterdorfer, P., Hummer, G., De Yoreo, J.J., Dufrêne, Y.F. & Alsteens, D. 2021. Atomic force microscopy-based force spectroscopy and multiparametric imaging of biomolecular and cellular systems. *Chemical Reviews* 121(19): 11701–11725.

Nagati, V., Kallubai, M., Chinthapalli, D.K. & Subramanyam, R. 2019. Exploration of binding studies of  $\beta$ -oxalyldiamino propionic acid ( $\beta$ -ODAP), a non-protein amino acid with human serum albumin-biophysical and computational approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37(15): 3914–3922.

Naik, R.S., Pawar, S.K., Tandel, R.D. & J, S. 2018. Insights in to the mechanism of interaction of a thrombin inhibitor, dabigatran etexilate with human serum albumin and influence of  $\beta$ -cyclodextrin on binding: Spectroscopic and computational approach. *Journal of Molecular Liquids* 251: 119–127.

Naqvi, A.A.T., Mohammad, T., Hasan, G.M. & Hassan, M.I. 2018. Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18(20): 1755–1768.

Nishi, K., Maruyama, T., Halsall, H.B., Handa, T. & Otagiri, M. 2004. Binding of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein to membrane results in a unique structural change and ligand release. *Biochemistry* 43(32): 10513–10519.

Nishi, K., Ono, T., Nakamura, T., Fukunaga, N., Izumi, M., Watanabe, H., Suenaga, A., Maruyama, T., Yamagata, Y., Curry, S. & Otagiri, M. 2011. Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1\*S forms. *Journal of Biological Chemistry* 286(16): 14427–14434.

Nishi, K., Ueno, M., Murakami, Y., Fukunaga, N., Akuta, T., Kadowaki, D., Watanabe, H., Suenaga, A., Maruyama, T. & Otagiri, M. 2009. A site-directed mutagenesis study of

- drug-binding selectivity in genetic variants of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98(11): 4316–4326.
- Nishio, T., Takamura, N., Nishii, R., Tokunaga, J., Yoshimoto, M. & Kawai, K. 2008. Influences of haemodialysis on the binding sites of human serum albumin: possibility of an efficacious administration plan using binding inhibition. *Nephrology Dialysis Transplantation* 23(7): 2304–2310.
- Nurdiansyah, R., Rifa'i, M. & Widodo. 2016. A comparative analysis of serum albumin from different species to determine a natural source of albumin that might be useful for human therapy. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 11(3): 243–249.
- O'Boyle, N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T. & Hutchison, G.R. 2011. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics* 3(1): 33.
- Obeng, S., Kamble, S.H., Reeves, M.E., Restrepo, L.F., Patel, A., Behnke, M., Chear, N.J.Y., Ramanathan, S., Sharma, A., León, F., Hiranita, T., Avery, B.A., McMahon, L.R. & McCurdy, C.R. 2020. Investigation of the adrenergic and opioid binding affinities, metabolic stability, plasma protein binding properties, and functional effects of selected indole-based kratom alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry* 63(1): 433–439.
- Obeng, S., Wilkerson, J.L., León, F., Reeves, M.E., Restrepo, L.F., Gamez-Jimenez, L.R., Patel, A., Pennington, A.E., Taylor, V.A., Ho, N.P., Braun, T., Fortner, J.D., Crowley, M.L., Williamson, M.R., Pallares, V.L.C., Mottinelli, M., Lopera-Londoño, C., McCurdy, C.R., McMahon, L.R. & Hiranita, T. 2021. Pharmacological comparison of mitragynine and 7-hydroxymitragynine: *In vitro* affinity and efficacy for  $\mu$ -opioid receptor and opioid-like behavioral effects in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 376(3): 410–427.
- Ogata, K., Takamura, N., Tokunaga, J., Kawai, K., Arimori, K. & Higuchi, S. 2008. Dosage plan of a flurbiprofen injection product using inhibition of protein binding by lipid emulsion in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60(1): 15–20.
- Ohbatake, Y., Fushida, S., Tsukada, T., Kinoshita, J., Oyama, K., Hayashi, H., Miyashita, T., Tajima, H., Takamura, H., Ninomiya, I., Yashiro, M., Hirakawa, K. & Ohta, T. 2016. Elevated  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in gastric cancer patients inhibits the anticancer effects of paclitaxel, effects restored by co-administration of erythromycin. *Clinical and Experimental Medicine* 16(4): 585–592.
- Orio, L., Alexandru, L., Cravotto, G., Mantegna, S. & Barge, A. 2012. UAE, MAE, SFE-CO<sub>2</sub> and classical methods for the extraction of *Mitragyna speciosa* leaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 19(3): 591–595.
- Osawa, M., Hada, N., Matsumoto, K., Hasegawa, T., Kobayashi, D., Morimoto, Y., Yamaguchi, M., Kanamoto, I., Nakagawa, T. & Sugibayashi, K. 2005. Usefulness of coadministration of bucolome in warfarin therapy: pharmacokinetic and

- pharmacodynamic analysis using outpatient prescriptions. *International Journal of Pharmaceutics* 293(1–2): 43–49.
- Owczarzy, A., Rogóż, W., Kulig, K., Pożycka, J., Zięba, A. & Maciążek-Jurczyk, M. 2023. Spectroscopic studies of quinobenzothiazine derivative in terms of the *in vitro* interaction with selected human plasma proteins: Part 2. *Molecules* 28(2): 698.
- Paar, M., Rossmann, C., Nussold, C., Wagner, T., Schlagenhaut, A., Leschnik, B., Oettl, K., Koestenberger, M., Cvirn, G. & Hallström, S. 2017. Anticoagulant action of low, physiologic, and high albumin levels in whole blood. *PLoS ONE* 12(8): e0182997.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4(11): 2411–2423.
- Pantano, F., Tittarelli, R., Mannocchi, G., Zaami, S., Ricci, S., Giorgetti, R., Terranova, D., Busardò, F.P. & Marinelli, E. 2016. Hepatotoxicity induced by “the 3Ks”: Kava, kratom and khat. *International Journal of Molecular Sciences* 17(4).
- Parrinello, M. & Rahman, A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* 52(12): 7182–7190.
- Paris, G., Kraszewski, S., Ramseyer, C. & Enescu, M. 2012. About the structural role of disulfide bridges in serum albumins: Evidence from protein simulated unfolding. *Biopolymers* 97(11): 889–898.
- Parthasarathy, S., Bin Azizi, J., Ramanathan, S., Ismail, S., Sasidharan, S., Said, M.I.M. & Mansor, S.M. 2009. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. *Molecules* 14(10): 3964–3974.
- Parthasarathy, S., Ramanathan, S., Ismail, S., Adenan, M.I., Mansor, S.M. & Murugaiyah, V. 2010. Determination of mitragynine in plasma with solid-phase extraction and rapid HPLC–UV analysis, and its application to a pharmacokinetic study in rat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(5): 2023–2030.
- Parthasarathy, S., Ramanathan, S., Murugaiyah, V., Hamdan, M.R., Mohd Said, M.I., Lai, C.-S. & Mansor, S.M. 2013. A simple HPLC–DAD method for the detection and quantification of psychotropic mitragynine in *Mitragyna speciosa* (ketum) and its products for the application in forensic investigation. *Forensic Science International* 226(1–3): 183–187.
- Pawar, S.K., Kalalbandi, V.K.A. & Jaldappagari, S. 2018. Interaction of indole derivative with human serum albumin: a combined spectroscopic and molecular dynamics study. *ChemistrySelect* 3(43): 12080–12088.
- Pearson, B.J., Campbell, S.M., Avery, B., McCurdy, C., Francisco, J., Sharma, A. & Kjelgren, R. 2020. Preliminary examination of mitragynine and 7-

hydroxymitragynine synthesis in response to production environment and postharvest techniques of *Mitragyna speciosa*. *Acta Horticulturae* 1274(1274): 89–96.

Pereira, V.J., Weinberg, H.S., Linden, K.G. & Singer, P.C. 2007. UV degradation kinetics and modeling of pharmaceutical compounds in laboratory grade and surface water via direct and indirect photolysis at 254 nm. *Environmental Science & Technology* 41(5): 1682–1688.

Peters, T. 1985. Serum albumin. Dlm. Anfinsen, C.B., Edsall, J.T. & Ricards, F.M. (pnyt.). *Advances in Protein Chemistry*, hlm. 161–245. Cooperstown: Academic Press.

Peters, T. Jr. 1996. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. San Diego: Academic Press.

Petitpas, I., Petersen, C.E., Ha, C.-E., Bhattacharya, A.A., Zunszain, P.A., Ghuman, J., Bhagavan, N. V. & Curry, S. 2003. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(11): 6440–6445.

Petterson, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13): 1605–1612.

Pires, D.E. V., Blundell, T.L. & Ascher, D.B. 2015. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* 58(9): 4066–4072.

Pitekova, B., Uhlíkova, E., Kupcova, V., Durfinova, M., Mojto, V. & Turecky, L. 2019. Can alpha-1-acid glycoprotein affect the outcome of treatment in a cancer patient?. *Bratislava Medical Journal* 120(01): 9–14.

Pleshakova, T., Bukharina, N., Archakov, A. & Ivanov, Y. 2018. Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4): 1142.

Poca, M., Concepción, M., Casas, M., Álvarez-Urturi, C., Gordillo, J., Hernández-Gea, V., Román, E., Guarner-Argente, C., Gich, I., Soriano, G. & Guarner, C. 2012. Role of albumin treatment in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10(3): 309–315.

Pol-Fachin, L., Fernandes, C.L. & Verli, H. 2009. GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydrate Research* 344(4): 491–500.

Polito, C. & Martin, G.S. 2013. Albumin: physiologic and clinical effects on lung function. *Minerva Anestesiologica* 79(10): 1180–6.

- Ponglux, D., Wongseripipatana, S., Takayama, H., Kikuchi, M., Kurihara, M., Kitajima, M., Aimi, N. & Sakai, S. 1994. A New Indole Alkaloid, 7  $\alpha$ -Hydroxy-7 H -mitragynine, from *Mitragyna speciosa* in Thailand. *Planta Medica* 60(06): 580–581.
- Prasanna, S. & Doerksen, R. 2009. Topological polar surface area: a useful descriptor in 2D-QSAR. *Current Medicinal Chemistry* 16(1): 21–41.
- Prozeller, D., Morsbach, S. & Landfester, K. 2019. Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle–protein interactions. *Nanoscale* 11(41): 19265–19273.
- Prozialeck, W.C., Avery, B.A., Boyer, E.W., Grundmann, O., Henningfield, J.E., Kruegel, A.C., McMahan, L.R., McCurdy, C.R., Swogger, M.T., Veltri, C.A. & Singh, D. 2019. Kratom policy: The challenge of balancing therapeutic potential with public safety. *International Journal of Drug Policy* 70: 70–77.
- Prozialeck, W.C., Jivan, J.K. & Andurkar, S. V. 2012. Pharmacology of kratom: An emerging botanical agent with stimulant, analgesic and opioid-like effects. *Journal of the American Osteopathic Association* 112(12): 792–799.
- Purintrapiban, J., Keawpradub, N., Kansanalak, S., Chittrakarn, S., Janchawee, B. & Sawangjaroen, K. 2011. Study on glucose transport in muscle cells by extracts from *Mitragyna speciosa* (Korth) and mitragynine. *Natural Product Research* 25(15): 1379–1387.
- Qiong, L. & Yin, J. 2022. Characterization of alpha-1-acid glycoprotein as a potential biomarker for breast cancer. *Bioengineered* 13(3): 5818–5826.
- Raghav, A., Ahmad, J. & Alam, K. 2017. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin and its effect on antibodies profile in patients with diabetes mellitus. *PLoS ONE* 12(5): e0176970.
- Ramanathan, S., Parthasarathy, S., Murugaiyah, V., Magosso, E., Tan, S. & Mansor, S. 2015. Understanding the physicochemical properties of mitragynine, a principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, for preclinical evaluation. *Molecules* 20(3): 4915–4927.
- Ramírez, D. & Caballero, J. 2018. Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data? *Molecules* 23(5): 1038.
- Reanmongkol, W., Keawpradub, N. & Sawangjaroen, K. 2007. Effects of the extracts from *Mitragyna speciosa* Korth. leaves on analgesic and behavioral activities in experimental animals. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 29(Suppl. 1): 39–48.
- Ree, I.M.C., Smits-Wintjens, V.E.H.J., van der Bom, J.G., van Klink, J.M.M., Oepkes, D.

- & Lopriore, E. 2017. Neonatal management and outcome in alloimmune hemolytic disease. *Expert Review of Hematology* 10(7): 607–616.
- Rehman, F., Abubakar, M., Ridzwan, N.F.W., Mohamad, S.B., Abd. Halim, A.A. & Tayyab, S. 2024. Deciphering the binding mode and structural perturbations in floxuridine-human serum albumin complexation with spectroscopic, microscopic, and computational techniques. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 308(October 2023): 123641.
- Rehman, M.T., Shamsi, H. & Khan, A.U. 2014. Insight into the binding mechanism of imipenem to human serum albumin by spectroscopic and computational approaches. *Molecular Pharmaceutics* 11(6): 1785–1797.
- Reidenberg, M.M. & Drayer, D.E. 1984. Alteration of drug-protein binding in renal disease. *Clinical Pharmacokinetics* 9(Supplement 1): 18–26.
- Rimac, H., Debeljak, Ž., Bojić, M. & Miller, L. 2017. Displacement of drugs from human serum albumin: from molecular interactions to clinical significance. *Current Medicinal Chemistry* 24(18): 1930–1947.
- Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E. & Bourdon, E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters* 582(13): 1783–1787.
- Rodriguez, M., Ortega, I., Soengas, I., Leal, N., Suarez, E., Calvo, R. & Lukas, J.C. 2004. Alpha-1-acid glycoprotein directly affects the pharmacokinetics and the analgesic effect of methadone in the rat beyond protein binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93(11): 2836–2850.
- Ronit, A., Sharma, S., Baker, J. V., Mngqibisa, R., Delory, T., Caldeira, L., Ndembu, N., Lundgren, J.D. & Phillips, A.N. 2018. Serum albumin as a prognostic marker for serious non-AIDS endpoints in the strategic timing of antiretroviral treatment (START) study. *The Journal of Infectious Diseases* 217(3): 405–412.
- Ross, P.D. & Subramanian, S. 1981. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* 20(11): 3096–3102.
- Ruiz-Cabello, F. & Erill, S. 1984. Abnormal serum protein binding of acidic drugs in diabetes mellitus. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 36(5): 691–695.
- Ruiz, M. 2021. Into the labyrinth of the lipocalin  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Frontiers in Physiology* 12(June): 1–10.
- Sabetghadam, A., Navaratnam, V. & Mansor, S.M. 2013. Dose-response relationship, acute toxicity, and therapeutic index between the alkaloid extract of *Mitragyna speciosa* and its main active compound mitragynine in mice. *Drug Development Research* 74(1): 23–30.

- Sabetghadam, A., Ramanathan, S. & Mansor, S.M. 2010. The evaluation of antinociceptive activity of alkaloid, methanolic, and aqueous extracts of Malaysian *Mitragyna speciosa* Korth leaves in rats. *Pharmacognosy Research* 2(3): 181.
- Sadler, P.J., Tucker, A. & Viles, J.H. 1994. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> binding site of serum albumins. *European Journal of Biochemistry* 220(1): 193–200.
- Sakai, T., Takadate, A. & Otagiri, M. 1995. Characterization of binding site of uremic toxins on human serum albumin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18(12): 1755–1761.
- Salim, H.M., Choitrotussanijjah, Awwalia, E.S. & Alam, I.P. 2022. Anti-inflammatory effects and potential mechanisms of *Mitragyna speciosa* methanol extract on  $\lambda$ -karragenan-induced inflammation model. *Bali Medical Journal* 11(3): 1172–1175.
- Salim, H.M., Puspitarini, M.D., Setiwati, Y. & Shimabukuro, M. 2021. Antibacterial mechanism of Kratom (*Mitragyna speciosa*) methanol extract on *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli* bacteria. *Biomolecular and Health Science Journal* 4(2): 98.
- Salmaso, V. & Moro, S. 2018. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Frontiers in Pharmacology* 9(Aug): 1–16.
- Salo-Ahen, O.M.H., Alanko, I., Bhadane, R., Bonvin, A.M.J.J., Honorato, R.V., Hossain, S., Juffer, A.H., Kabedev, A., Lahtela-Kakkonen, M., Larsen, A.S., Lescrinier, E., Marimuthu, P., Mirza, M.U., Mustafa, G., Nunes-Alves, A., Pansar, T., Saadabadi, A., Singaravelu, K. & Vanmeert, M. 2020. Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development. *Processes* 9(1): 71.
- Saref, A., Suraya, S., Singh, D., Grundmann, O., Narayanan, S., Swogger, M.T., Prozialeck, W.C., Boyer, E., Chear, N.J.Y. & Balasingam, V. 2019. Self-reported prevalence and severity of opioid and kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) side effects. *Journal of Ethnopharmacology* 238(February): 111876.
- Schifano, F., Orsolini, L., Duccio Papanti, G. & Corkery, J.M. 2015. Novel psychoactive substances of interest for psychiatry. *World Psychiatry* 14(1): 15–26.
- Schmidt, S., Gonzalez, D. & Derendorf, H. 2010. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(3): 1107–1122.
- Schönfeld, D.L., Ravelli, R.B.G., Mueller, U. & Skerra, A. 2008. The 1.8-Å crystal structure of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *Journal of Molecular Biology* 384(2): 393–405.

- Schüttelkopf, A.W. & van Aalten, D.M.F. 2004. PRODRG : a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 60(8): 1355–1363.
- Setoguchi, N., Takamura, N., Fujita, K., Ogata, K., Tokunaga, J., Nishio, T., Chosa, E., Arimori, K., Kawai, K. & Yamamoto, R. 2013. A diclofenac suppository-nabumetone combination therapy for arthritic pain relief and a monitoring method for the diclofenac binding capacity of HSA site II in rheumatoid arthritis. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 34(2): 125–136.
- Shahlaei, M., Rahimi, B., Nowroozi, A., Ashrafi-Kooshk, M.R., Sadrjavadi, K. & Khodarahmi, R. 2015. Exploring binding properties of sertraline with human serum albumin: Combination of spectroscopic and molecular modeling studies. *Chemico-Biological Interactions* 242: 235–246.
- Shaik Mossadeq, W.M., Sulaiman, M.R., Tengku Mohamad, T.A., Chiong, H.S., Zakaria, Z.A., Jabit, M.L., Baharuldin, M.T.H. & Israf, D.A. 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Mitragyna speciosa* Korth methanolic extract. *Medical Principles and Practice* 18(5): 378–384.
- Shamsi, A., Shahwan, M., Khan, M.S., Alhumaydhi, F.A., Alsagaby, S.A., Abdulmonem, W. Al, Abdullaev, B. & Yadav, D.K. 2022. Mechanistic insight into binding of huperzine a with human serum albumin: Computational and spectroscopic approaches. *Molecules* 27(3): 1–13.
- Sharma, A. & Pathania, A. 2022. Diverse practices applicable for exploring the drug binding with protein – A review. *Materials Today: Proceedings* 48: 1575–1581.
- Shemyakin, I.G., Pukhalsky, A.L., Stepanshina, V.N., Shmarina, G. V., Aleshkin, V.A. & Afanas'ev, S.S. 2005. Preventive and therapeutic effects of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in mice infected with *B. anthracis*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 140(4): 439–444.
- Shimazaki, Y., Yajima, T. & Yamauchi, O. 2015. Properties of the indole ring in metal complexes. A comparison with the phenol ring. *Journal of Inorganic Biochemistry* 148: 105–115.
- Sidwell, R.W., Wong, M.H., Bailey, K.W., Barnard, D.L., Jackson, M.K. & Smee, D.F. 2001. Utilization of alpha-1-acid glycoprotein levels in the serum as a parameter for *in vivo* assay of influenza virus inhibitors. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 12(6): 359–365.
- Singh, D., Müller, C.P. & Vicknasingam, B.K. 2014. Kratom (*Mitragyna speciosa*) dependence, withdrawal symptoms and craving in regular users. *Drug and Alcohol Dependence* 139: 132–137.
- Singh, D., Narayanan, S., Müller, C.P., Vicknasingam, B., Yücel, M., Ho, E.T.W., Hassan,

- Z. & Mansor, S.M. 2018. Long-term cognitive effects of kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) use. *Journal of Psychoactive Drugs* 51(1): 19–27.
- Smith, K.E. & Lawson, T. 2017. Prevalence and motivations for kratom use in a sample of substance users enrolled in a residential treatment program. *Drug and Alcohol Dependence* 180(August): 340–348.
- Smith, D.A., Di, L. & Kerns, E.H. 2010. The effect of plasma protein binding on *in vivo* efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 9(12): 929–939.
- Smith, D.A. & Rowland, M. 2019. Intracellular and intraorgan concentrations of small molecule drugs: Theory, uncertainties in infectious diseases and oncology, and promise. *Drug Metabolism and Disposition* 47(6): 665–672.
- Smith, S.A. & Waters, N.J. 2019. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drugs binding to alpha-1-acid glycoprotein. *Pharmaceutical Research* 36(2): 1–19.
- Sonavane, S., Haider, S.Z., Kumar, A. & Ahmad, B. 2017. Hemin is able to disaggregate lysozyme amyloid fibrils into monomers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1865(11): 1315–1325.
- Sornsene P, Chimplee S, Romyasmit C. 2023. Evaluation of antibacterial, antibiofilm, antioxidant, and anti-inflammatory activities of kratom leaves (*Mitragyna speciosa*) fermentation supernatant containing *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 10142.
- Soudahome, A.G., Catan, A., Giraud, P., Assouan Kouao, S., Guerin-Dubourg, A., Debussche, X., Le Moullec, N., Bourdon, E., Bravo, S.B., Paradela-Dobarro, B., Álvarez, E., Meilhac, O., Rondeau, P. & Couprie, J. 2018. Glycation of human serum albumin impairs binding to the glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide. *Journal of Biological Chemistry* 293(13): 4778–4791.
- Spetea, M. & Schmidhammer, H. 2019. Unveiling 7-hydroxymitragynine as the key active metabolite of mitragynine and the promise for creating novel pain relievers. *ACS Central Science* 5(6): 936–938.
- Spiller, F., Carlos, D., Souto, F.O., De Freitas, A., Soares, F.S., Vieira, S.M., Paula, F.J.A., Alves-Filho, J.C. & Cunha, F.Q. 2012. A1-acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. *Diabetes* 61(6): 1584–1591.
- Spinella, R., Sawhney, R. & Jalan, R. 2016. Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. *Hepatology International* 10(1): 124–132.
- Srivastava, R. 2021. Theoretical studies on the molecular properties, toxicity, and

- biological efficacy of 21 new chemical entities. *ACS Omega* 6(38): 24891–24901.
- Srivastava, V.K. & Yadav, R. 2019. Isothermal titration calorimetry. Dlm. Misra, G. (pnyt.). *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, hlm. 125–137 New York: Elsevier.
- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M. & Kobayashi, K. 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering, Design and Selection* 12(6): 439–446.
- Summerfield, S.G., Yates, J.W.T. & Fairman, D.A. 2022. Free drug theory – no longer just a hypothesis? *Pharmaceutical Research* 39(2): 213–222.
- Superti, F., Marziano, M.L., Tinari, A. & Donelli, G. 1993. Effect of polyions on the infectivity of SA-11 rotavirus in LCC-MK2 cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 16(1): 55–62.
- Taguchi, K., Nishi, K., Giam Chuang, V.T., Maruyama, T. & Otagiri, M. 2013. Molecular aspects of human alpha-1 acid glycoprotein -structure and function. Dlm. Feas, F. (pnyt.). *Acute Phase Proteins*, hlm. 139–162. Rijeka: InTech.
- Takayama, H. 2004. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceous plant, *Mitragyna speciosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52(8): 916–928.
- Takayama, H., Kurihara, M., Kitajima, M., Said, I.M. & Aimi, N. 1998. New indole alkaloids from the leaves of Malaysian *Mitragyna speciosa*. *Tetrahedron* 54(29): 8433–8440.
- Takamura, N., Maruyama, T. & Otagiri, M. 1997. Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: Possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clinical Chemistry* 43(12): 2274–2280.
- Talib, J., Beck, J.L. & Ralph, S.F. 2006. A mass spectrometric investigation of the binding of gold antiarthritic agents and the metabolite [Au(CN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> to human serum albumin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11(5): 559–570.
- Tanna, R.S., Nguyen, J.T., Hadi, D.L., Manwill, P.K., Flores-Bocanegra, L., Layton, M.E., White, J.R., Cech, N.B., Oberlies, N.H., Rettie, A.E., Thummel, K.E. & Paine, M.F. 2022. Clinical pharmacokinetic assessment of kratom (*Mitragyna speciosa*), a botanical product with opioid-like effects, in healthy adult participants. *Pharmaceutics* 14(3): 1–16.
- Tanna, R.S., Tian, D.-D., Cech, N.B., Oberlies, N.H., Rettie, A.E., Thummel, K.E. & Paine, M.F. 2021. Refined prediction of pharmacokinetic kratom-drug interactions: Time-dependent inhibition considerations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 376(1): 64–73.

- Tayyab, S. & Feroz, S.R. 2021. Serum albumin: clinical significance of drug binding and development as drug delivery vehicle. Dlm. Eisenberg, D.S. & Richards, F.M. (pnyt.). *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, hlm. 193–218. London: Elsevier Ltd.
- Tesseromatis, C., Alevizou, A., Tigka, E. & Kotsiou, A. 2011. Acute-phase proteins: alpha -1- acid glycoprotein. Dlm. *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*, hlm. 247–260. Rijeka: InTech.
- Trainor, G.L. 2007. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2(1): 51–64.
- Trakulsrichai, S., Sathirakul, K., Auparakkitanon, S., Krongvorakul, J., Sueajai, J., Noumjad, N., Sukasem, C. & Wananukul, W. 2015. Pharmacokinetics of mitragynine in man. *Drug Design, Development and Therapy* 9: 2421.
- Tsuda, Y., Tsunoi, T., Watanabe, N., Ishida, M., Yamada, H. & Itoh, T. 2001. Stereoselective binding and degradation of sulbenicillin in the presence of human serum albumin. *Chirality* 13(5): 236–243.
- Uhlig, C., Silva, P.L., Deckert, S., Schmitt, J. & de Abreu, M.G. 2014. Albumin versus crystalloid solutions in patients with the acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care* 18(1): R10.
- Utar, Z., Majid, M.I.A., Adenan, M.I., Jamil, M.F.A. & Lan, T.M. 2011. Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E 2 production induced by lipopolysaccharide in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology* 136(1): 75–82.
- Uslu, A., Tümay, S.O. & Yeşilot, S. 2022. Fluorescent materials based on phosphazene derivatives and their applications: Sensors and optoelectronic devices. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 53(May):100553.
- Uzelac, T.N., Nikolić-Kokić, A.L., Spasić, S.D., Mačvanin, M.T., Nikolić, M.R., Mandić, L.M. & Jovanović, V.B. 2019. Opposite clozapine and ziprasidone effects on the reactivity of plasma albumin SH-group are the consequence of their different binding properties dependent on protein fatty acids content. *Chemico-Biological Interactions* 311(5): 108787.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. & Berendsen, H.J.C. 2005. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* 26(16): 1701–1718.
- van der Spoel, D., van Maaren, P.J. & Berendsen, H.J.C. 1998. A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *The Journal of Chemical Physics* 108(24): 10220–10230.

- van de Weert, M. & Stella, L. 2011. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure* 998(1–3): 145–150.
- van Gunsteren, W.F. & Berendsen, H.J.C. 1988. A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation* 1(3): 173–185.
- Váradi, A., Marrone, G.F., Palmer, T.C., Narayan, A., Szabó, M.R., Le Rouzic, V., Grinnell, S.G., Subrath, J.J., Warner, E., Kalra, S., Hunkele, A., Pagirsky, J., Eans, S.O., Medina, J.M., Xu, J., Pan, Y.-X., Borics, A., Pasternak, G.W., McLaughlin, J.P. & Majumdar, S. 2016. Mitragynine/Corynantheidine pseudoindoxyls as opioid analgesics with mu agonism and delta antagonism, which do not recruit  $\beta$ -arrestin-2. *Journal of Medicinal Chemistry* 59(18): 8381–8397.
- Veeramohan, R., Zamani, A.I., Azizan, K.A., Goh, H.-H., Aizat, W.M., Razak, M.F.A., Yusof, N.S.M., Mansor, S.M., Baharum, S.N. & Ng, C.L. 2023. Comparative metabolomics analysis reveals alkaloid repertoires in young and mature *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. Leaves. *PLoS ONE* 18(3): e0283147.
- Vicknasingam, B., Narayanan, S., Beng, G.T. & Mansor, S.M. 2010. The informal use of ketum (*Mitragyna speciosa*) for opioid withdrawal in the northern states of peninsular Malaysia and implications for drug substitution therapy. *International Journal of Drug Policy* 21(4): 283–288.
- Vlasov, H., Juvonen, T., Hiippala, S., Suojaranta, R., Peltonen, M., Schramko, A., Arvonen, K., Salminen, U.-S., Kleine Budde, I., Eränen, T., Mazanikov, M., Meinberg, M., Vähäsilta, T., Wilkman, E., Pettilä, V. & Pesonen, E. 2020. Effect and safety of 4% albumin in the treatment of cardiac surgery patients: study protocol for the randomized, double-blind, clinical ALBICS (ALBumin In Cardiac Surgery) trial. *Trials* 21(1): 235.
- Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J., Carrupt, P. & Martel, S. 2010. Drug–protein binding: a critical review of analytical tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(1): 53–66.
- Vuppala, P.K., Boddu, S.P., Furr, E.B., McCurdy, C.R. & Avery, B.A. 2011. Simple, sensitive, high-throughput method for the quantification of mitragynine in rat plasma using UPLC-MS and its application to an intravenous pharmacokinetic study. *Chromatographia* 74(9–10): 703–710.
- Vuppala, P.K., Jamalapuram, S., Furr, E.B., McCurdy, C.R. & Avery, B.A. 2013. Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the determination of 7-hydroxymitragynine, a  $\mu$ -opioid agonist, in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* 27(12): 1726–1732.
- Wanat, K. 2020. Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them. *Molecular Biology Reports* 47(4): 3221–3231.

- Wanat, K., Brzezińska, E. & Sobańska, A.W. 2018. Aspects of drug-protein binding and methods of analyzing the phenomenon. *Current Pharmaceutical Design* 24(25): 2974–2985.
- Wang, B.L., Kou, S.B., Lin, Z.Y. & Shi, J.H. 2020a. Insight into the binding behavior of ceritinib on human  $\alpha$ -1 acid glycoprotein: Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 232: 118160
- Wang, B.-L., Kou, S.-B., Lin, Z.-Y., Shi, J.-H. & Liu, Y.-X. 2020b. Insights on the interaction mechanism of brigatinib to human  $\alpha$ -1-acid glycoprotein: Experimental and computational approaches. *International Journal of Biological Macromolecules* 157: 340–349.
- Wang, L., Zhang, W., Shao, Y., Zhang, D., Guo, G. & Wang, X. 2022. Analytical methods for obtaining binding parameters of drug–protein interactions: A review. *Analytica Chimica Acta* 1219(June): 340012.
- Wang, Q., Sun, Q., Ma, X., Rao, Z. & Li, H. 2015. Probing the binding interaction of human serum albumin with three bioactive constituents of *Eriobotrya japonica* leaves: Spectroscopic and molecular modeling approaches. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 148: 268–276.
- Wani, T.A., Bakheit, A.H., Zargar, S., Bhat, M.A. & Al-Majed, A.A. 2019. Molecular docking and experimental investigation of new indole derivative cyclooxygenase inhibitor to probe its binding mechanism with bovine serum albumin. *Bioorganic Chemistry* 89(May): 103010.
- Warner, M.L., Kaufman, N.C. & Grundmann, O. 2016. The pharmacology and toxicology of kratom: From traditional herb to drug of abuse. *International Journal of Legal Medicine* 130(1): 127–138.
- Williams, R.S. & Nikitin, D. 2020. The internet market for kratom, an opioid alternative and variably legal recreational drug. *International Journal of Drug Policy* 78: 102715.
- Xu, L., Hu, Y.-X., Li, Y.-C., Liu, Y.-F., Zhang, L., Ai, H.-X. & Liu, H.-S. 2017. Study on the interaction of paeoniflorin with human serum albumin (HSA) by spectroscopic and molecular docking techniques. *Chemistry Central Journal* 11(1): 116.
- Ya, K., Tangamornsuksan, W., Scholfield, C.N., Methaneethorn, J. & Lohitnavy, M. 2019. Pharmacokinetics of mitragynine, a major analgesic alkaloid in kratom (*Mitragyna speciosa*): A systematic review. *Asian Journal of Psychiatry* 43: 73–82.
- Yamasaki, K., Chuang, V.T.G., Maruyama, T. & Otagiri, M. 2013. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(12): 5435–5443.

- Yamasaki, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U. & Otagiri, M. 1996. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1295(2): 147–157.
- Yamasaki, K., Hyodo, S., Taguchi, K., Nishi, K., Yamaotsu, N., Hirono, S., Chuang, V.T.G., Seo, H., Maruyama, T. & Otagiri, M. 2017. Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin. *PLoS ONE* 12(6): e0180404.
- Yamine, A., Gao, J. & Kwan, A. 2019. Tryptophan fluorescence quenching assays for measuring protein-ligand binding affinities: Principles and a practical guide. *Bio-Protocol* 9(11).
- Yang, F., Zhang, Y. & Liang, H. 2014. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *International Journal of Molecular Sciences* 15(3): 3580–3595.
- Yeggoni, D.P., Rachamalla, A., Kallubai, M. & Subramanyam, R. 2015. Cytotoxicity and comparative binding mechanism of piperine with human serum albumin and  $\alpha$ -1-acid glycoprotein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33(6): 1336–1351.
- Yildirim, A., Meral, M., Kaynar, H., Polat, H. & Ucar, E.Y. 2007. Relationship between serum levels of some acute-phase proteins and stage of disease and performance status in patients with lung cancer. *Medical Science Monitor : International Medical Journal Of Experimental And Clinical Research* 13(4): CR195–200.
- Yuan, W., Li, G., Zeng, M. & Fu, B.M. 2010. Modulation of the blood-brain barrier permeability by plasma glycoprotein orosomucoid. *Microvascular Research* 80(1): 148–157.
- Yuniarti, R., Nadia, S., Alamanda, A., Zubir, M., Syahputra, R.A. & Nizam, M. 2020. Characterization, phytochemical screenings and antioxidant activity test of kratom leaf ethanol extract (*Mitragyna speciosa* Korth) using DPPH method. *Journal of Physics: Conference Series* 1462(1): 012026.
- Yusof, S.R., Mohd Uzid, M., Teh, E.-H., Hanapi, N.A., Mohideen, M., Mohamad Arshad, A.S., Mordi, M.N., Loryan, I. & Hammarlund-Udenaes, M. 2019. Rate and extent of mitragynine and 7-hydroxymitragynine blood-brain barrier transport and their intra-brain distribution: the missing link in pharmacodynamic studies. *Addiction Biology* 24(5): 935–945.
- Yusoff, N.H.M., Suhaimi, F.W., Vadivelu, R.K., Hassan, Z., Rümmler, A., Rotter, A., Amato, D., Dringenberg, H.C., Mansor, S.M., Navaratnam, V. & Müller, C.P. 2016. Abuse potential and adverse cognitive effects of mitragynine (kratom). *Addiction Biology* 21(1): 98–110.
- Zacharioudaki, D.-E., Fitis, I. & Kotti, M. 2022. Review of fluorescence spectroscopy in

environmental quality applications. *Molecules* 27(15): 4801.

Zanger, U.M. & Schwab, M. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics* 138(1): 103–141.

Zhang, H., Zhou, D. & Xia, Q. 2018. Study on the molecular recognition action of lamivudine by human serum albumin. *Journal of Molecular Recognition* 31(7): 1–8.

Zheng, K., Liu, H., Liu, X., Wang, Y., Li, L., Li, S., Xue, J. & Huang, M. 2020. Tumor targeting chemo- and photodynamic therapy packaged in albumin for enhanced anti-tumor efficacy. *International Journal of Nanomedicine* 15: 151–167.

Zhou, R., Perez-Aguilar, J.M., Meng, Q., Saven, J.G. & Liu, R. 2012. Opioid binding sites in human serum albumin. *Anesthesia and Analgesia* 114(1): 122–128.

Zhu, L., Yang, F., Chen, L., Meehan, E.J. & Huang, M. 2008. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug–drug interaction studied by X-ray crystallography. *Journal of Structural Biology* 162(1): 40–49.

Zsila, F. 2013. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: Toward the three-sites model. *Molecular Pharmaceutics* 10(5): 1668–1682.

Zsila, F. 2023. Quorum sensing-associated bacterial phenazines are potential ligands of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Journal of Molecular Recognition* 36(7): 1–12.

Zsila, F. & Iwao, Y. 2007. The drug binding site of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: Insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770(5): 797–809

Zunszain, P.A., Ghuman, J., McDonagh, A.F. & Curry, S. 2008. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX $\alpha$ . *Journal of Molecular Biology* 381(2): 394–406.

## LAMPIRAN A

### SURAT KEBENARAN MEMILIKI BAHAN PSIKOTROPIK



**KEMENTERIAN KESIHATAN MALAYSIA**  
*Ministry of Health Malaysia*  
**Bahagian Penguatkuasaan Farmasi**  
*Pharmacy Enforcement Division*  
 Lot 36, Jalan Prof Diraja Ungku Aziz, Petaling Jaya  
 46200 SELANGOR  
 MALAYSIA

Tel: 03-7841 3200  
 Faks: 03-7968 2251  
 Laman Web: [www.pharmacy.gov.my](http://www.pharmacy.gov.my)

#### [POS BERDAFTAR]

Rujukan Kami: KKM.600-11/2/15 Jld. 8 ( 11 )  
 Tarikh : 10/06/2022

Prof. Dr. Shukor Md. Nor,  
 Pengerusi,  
 Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi,  
 Fakulti Sains dan Teknologi,  
 Universiti Kebangsaan Malaysia  
 43600 UKM Bangi, SELANGOR.

YBrs. Prof.,

#### **PERMOHONAN KEBENARAN MEMILIKI BAHAN PSIKOTROPIK DI BAWAH PERATURAN-PERATURAN RACUN (BAHAN-BAHAN PSIKOTROPIK) 1989**

Saya dengan hormatnya merujuk kepada perkara tersebut di atas dan surat permohonan YBrs. Prof. yang bertarikh pada 23 Mac 2022 adalah berkaitan.

2. Bersama-sama ini disertakan kebenaran di bawah Peraturan-Peraturan Racun (Bahan-Bahan Psikotropik) 1989 bagi membenarkan pihak YBrs. Prof. (seperti yang dinamakan dalam kebenaran tersebut) untuk memiliki bahan psikotropik setakat yang diperlukan untuk tujuan penyelidikan di premis yang dinyatakan dalam kebenaran.
3. Dimaklumkan bahawa pihak YBrs. Prof. adalah bertanggungjawab sepenuhnya terhadap penggunaan yang wajar, keselamatan penyimpanan dan rekod penggunaan bahan psikotropik yang berkaitan.
4. Sila pastikan syarat yang dinyatakan dalam surat kebenaran dipatuhi. Kegagalan pihak YBrs. Prof. untuk mematuhi syarat yang ditetapkan akan menyebabkan permohonan akan datang tidak dipertimbangkan.
5. Kebenaran ini walau bagaimanapun, tidak mengecualikan pihak YBrs. Prof. daripada keperluan undang-undang Malaysia yang lain dan tertakluk kepada sebarang pindaan pada masa hadapan.

Sekian, terima kasih.

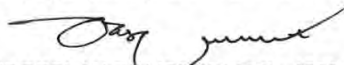


Rujukan Kami: KKM.600-11/2/15 Jld. 8 ( // )

**'WAWASAN KEMAKMURAN BERSAMA 2030'**

**"BERKHIDMAT UNTUK NEGARA"**

Saya yang menjalankan amanah,



**(ROESLAN BIN ISHAK) RPh. 1289**

Pengarah  
Bahagian Penguatkuasaan Farmasi  
Program Perkhidmatan Farmasi  
Kementerian Kesihatan Malaysia

MZA/ali/uma  
salina.mz@moh.gov.my/umadevi@moh.gov.my  
+603 - 7841 3223/3367  
+603 - 7968 2251

- s.k. 1. Timbalan Pengarah (Pelesenan)  
Bahagian Penguatkuasaan Farmasi  
Program Perkhidmatan Farmasi  
Kementerian Kesihatan Malaysia
2. Timbalan Pengarah Kesihatan Negeri (Farmasi)  
Jabatan Kesihatan Negeri Selangor



AKTA RACUN 1952 [AKTA 366]

PERATURAN-PERATURAN RACUN (BAHAN-BAHAN PSIKOTROPIK) 1989

KEBENARAN DI BAWAH PERENGGAN 3(2)(g)

PADA menjalankan kuasa yang diberi oleh perenggan 3(2)(g), Peraturan-Peraturan Racun (Bahan-Bahan Psikotropik) 1989, Ketua Pengarah Kesihatan dengan ini memberi kebenaran kepada Dr. Shevin Rizal bin Feroz; Nombor Kad Pengenalan: 891109-04-5555 dan Khairul Azreena Binti Bakar; Nombor Kad Pengenalan: 950330-13-6314 dari Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Selangor untuk memiliki bahan psikotropik yang diperihalkan dalam Jadual berkuat kuasa dari tarikh kebenaran ini hingga 31 Disember 2022 tertakluk kepada syarat berikut:

- (a) Bahan psikotropik itu dimiliki dan digunakan hanya untuk tujuan penyelidikan di Makmal Biologi Molekul, Makmal Resonan Magnetik Nuklear, Makmal Mikroskop Elektron dan Makmal Kimia Organik & Sintetik, Blok B, Institut Genom dan Vaksin Malaysia, National Institutes of Biotechnology Malaysia, Jalan Bangi, 43000 Kajang, Selangor dalam tempoh sah kebenaran ini;
- (b) Orang yang diberi kebenaran adalah bertanggungjawab sepenuhnya ke atas bahan psikotropik itu terutamanya dari segi penyimpanan dan perekodan;
- (c) Orang yang diberi kebenaran perlu menyimpan bahan psikotropik itu di tempat yang berkunci di mana kunci hanya dipegang oleh beliau dan tempat tersebut hanya dibuka dan ditutup oleh beliau sahaja;
- (d) Perundangan yang berkaitan dengan bahan psikotropik khasnya pembelian, penggunaan, penyimpanan, perekodan dan pelupusan

---

[No. Kebenaran: [KKM.600-11/2/15 ]ld. & ( // )]

hendaklah dipatuhi sebagaimana keperluan yang dikehendaki di bawah Akta Racun 1952 dan Peraturan-Peraturannya;

- (e) Ketua Pengarah Kesihatan boleh pada bila-bila masa meminda syarat yang dinyatakan dalam kebenaran ini; dan
- (f) Ketua Pengarah Kesihatan boleh membatalkan kebenaran ini pada bila-bila masa jika terdapat pelanggaran syarat yang dinyatakan atau mana-mana peruntukan undang-undang yang berkuat kuasa dan kebenaran ini mesti diserahkan kepadanya serta-merta.



*JADUAL*

Bahan Psikotropik Yang Dimiliki

*Bahan Psikotropik*

*Kuantiti*

Mitragynine

100mg

Bertarikh: 08/06/2022

TAN SRI DATO' SERI DR. NOOR HISHAM BIN ABDULLAH

*Ketua Pengarah Kesihatan*

## LAMPIRAN B

## SIMULASI DINAMIK MOLEKUL : FAIL NVT.MDP

```

title          = Protein-ligand complex NVT equilibration
define        = -DPOSRES ; position restrain the protein and ligand
; Run parameters
integrator     = md      ; leap-frog integrator
nsteps        = 50000   ; 2 * 50000 = 100 ps
dt            = 0.002   ; 2 fs
; Output control
nstenergy     = 500    ; save energies every 1.0 ps
nstlog        = 500    ; update log file every 1.0 ps
nstxout-compressed = 500 ; save coordinates every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation  = no     ; first dynamics run
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints   = h-bonds ; bonds to H are constrained
lincs_iter    = 1     ; accuracy of LINCS
lincs_order   = 4     ; also related to accuracy
; Neighbor searching and vdW
cutoff-scheme = Verlet
ns_type       = grid  ; search neighboring grid cells
nstlist       = 20    ; largely irrelevant with Verlet
rlist         = 1.2
vdwtype       = cutoff
vdw-modifier  = force-switch
rvdw-switch   = 1.0
rvdw          = 1.2  ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype   = PME    ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
rcoulomb      = 1.2    ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
pme_order     = 4     ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl        = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps       = Protein_LIG Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t         = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t         = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl        = no     ; no pressure coupling in NVT
; Periodic boundary conditions
pbc           = xyz    ; 3-D PBC
; Dispersion correction is not used for proteins with the C36 additive FF
DispCorr      = no
; Velocity generation
gen_vel       = yes    ; assign velocities from Maxwell distribution
gen_temp      = 300    ; temperature for Maxwell distribution
gen_seed      = -1     ; generate a random seed

```

## LAMPIRAN C

## SIMULASI DINAMIK MOLEKUL : FAIL NPT.MDP

```

title          = Protein-ligand complex NPT equilibration
define         = -DPOSRES ; position restrain the protein and ligand
; Run parameters
integrator     = md      ; leap-frog integrator
nsteps        = 50000   ; 2 * 50000 = 100 ps
dt            = 0.002   ; 2 fs
; Output control
nstenergy     = 500     ; save energies every 1.0 ps
nstlog        = 500     ; update log file every 1.0 ps
nstxout-compressed = 500 ; save coordinates every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation  = yes     ; continuing from NVT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints   = h-bonds ; bonds to H are constrained
lincs_iter    = 1       ; accuracy of LINCS
lincs_order   = 4       ; also related to accuracy
; Neighbor searching and vdW
cutoff-scheme = Verlet
ns_type       = grid    ; search neighboring grid cells
nstlist       = 20      ; largely irrelevant with Verlet
rlist         = 1.2
vdwtype       = cutoff
vdw-modifier   = force-switch
rvdw-switch    = 1.0
rvdw          = 1.2    ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype   = PME     ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
rcoulomb      = 1.2
pme_order     = 4       ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16  ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl        = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps       = Protein_UNL Water_ and_ ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t         = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t         = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl        = Berendsen ; pressure coupling is on for NPT
pcoupltype    = isotropic ; uniform scaling of box vectors
tau_p         = 2.0      ; time constant, in ps
ref_p         = 1.0      ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
refcoord_scaling = com
; Periodic boundary conditions
pbc           = xyz     ; 3-D PBC ; Dispersion correction is not used for proteins with the C36 additive
FF
DispCorr      = no ; Velocity generation
gen_vel       = no     ; velocity generation off after NVT

```

## LAMPIRAN D

## SIMULASI DINAMIK MOLEKUL : FAIL MD.MDP

```

title = Protein-ligand complex MD simulation
; Run parameters
integrator = md ; leap-frog integrator
nsteps = 50000000 ; 2 * 50000000 = 100000 ps (100 ns)
dt = 0.002 ; 2 fs
; Output control
nstxout = 0 ; suppress .trr output
nstvout = 0 ; suppress .trr output
nstenergy = 5000 ; save energies every 10.0 ps
nstlog = 5000 ; update log file every 10.0 ps
nstxout-compressed = 5000 ; write .xtc trajectory every 10.0 ps
compressed-x-grps = System
; Bond parameters
continuation = yes ; first dynamics run
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = all-bonds ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4 ; also related to accuracy
; Neighborsearching
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid ; search neighboring grid cells
nstlist = 10 ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet
rcoulomb = 1.4 ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw = 1.4 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein_UNL Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl = Parrinello-Rahman ; pressure coupling is on for NPT
pcoupltype = isotropic ; uniform scaling of box vectors
tau_p = 2.0 ; time constant, in ps
ref_p = 1.0 ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
gen_vel = no ; assign velocities from Maxwell distribution

```

**LAMPIRAN E****SENARAI PENERBITAN****PENYELIDIKAN KAJIAN**

1. **Bakar, K.A.**, Lam, S.D., Low, C-F. & Feroz, S.R. 2024. Feroz, S.R. 2024. *In silico* assessment of the ADMET properties of 7-hydroxymitragynine and its interaction with human serum albumin and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 14(6): 135. **(SCOPUS)**
2. **Bakar, K.A.**, Lam, S.D. & Feroz, S.R. 2024. Binding characteristics of the major kratom alkaloid, mitragynine, towards serum albumin: Spectroscopic, calorimetric, microscopic, and computational investigations. *Chemico-Biological Interaction* 404 : 111264. **(WoS Q1)**
3. **Bakar, K.A.** & Feroz, S.R. 2024. Probing the molecular interaction of mitragynine from kratom with human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein: Insights from spectroscopic, calorimetric, microscopic, and molecular modeling investigations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics (sedang diwasit)*. **(WoS Q2)**

**PENYELIDIKAN KAJIAN LAIN-LAIN**

1. **Bakar, K.A.** & Feroz, S.R. 2019. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 223: 117337. **(WoS Q1)**
2. **Bakar, K.A.**, Lam, S.D., Mohd Sidek, H. & Feroz, S.R. 2020. Characterization of the interaction of diosgenin with human serum albumin and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein using biophysical and bioinformatic tools. *Journal of Molecular Liquids*. 306 :112865. **(WoS Q1)**

3. Asngari, N.J.M., **Bakar, K.A.**, Feroz, S.R., Razak, F.A. & Halim, A.A.A. 2024. Interaction mechanism of a cysteine protease inhibitor, odanacatib, with human serum albumin: *In-vitro* and molecular docking studies. *Biophysical Chemistry* 305 : 107140. **(WoS Q2)**
4. Ravindar, L., Ng, Y.H., **Bakar, K.A.**, Ahmad Hidayat, A.F., Feroz, S.R., Raheem, S., Hasbullah, S.A. & Hassan, N.I. 2024. Synthesis, molecular docking and heme detoxification of pyrano [2,3-c] pyrazole-aminoquinoline hybrids as antimalarial agents. *Sains Malaysiana* 53 (8): 1953–1968. **(WoS Q3)**
5. **Bakar, K.A.**, Ng, Y.H. & Feroz, S.R. 2024. Computational insights into the interaction of muscimol with human serum albumin. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 14(6):132. **(SCOPUS)**
6. **Bakar, K.A.**, Ng, Y.H., Nazri, M.F., Muhamad, H.F., Subramaniam, T., Uithayakumar, R., Abdul Razar, A.N. & Feroz, S.R. 2024. Pencirian interaksi labetalol hidroklorida dengan albumin serum manusia dan glikoprotein asid- $\alpha_1$ . *Sains Malaysiana* 54(1):3495–3509. **(WoS Q3)**
7. Asngari, N.J.M., **Bakar, K.A.**, Feroz, S.R., Abdul Rahman, S.N.S., Razak, F.A. & Halim, A.A.A. 2024. An insight into the binding of ar-turmerone with human serum albumin using spectroscopic, microscopic and molecular docking techniques. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (sedang diwasit). **(WoS Q1)**

## LAMPIRAN F

## SENARAI PERSIDANGAN

1. **Bakar, K.A.,** Lam, S.D., Mohd Sidek, H. & Feroz, S.R. (2020). Interaction of steroidal sapogenin, diosgenin with human serum albumin and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein: multispectroscopic analyses and molecular modelling. *MSBMB-Taylor's Virtual Focused Meeting 2020*, pada 19 November 2020. **(PEMBENTANG POSTER).**
2. **Bakar, K.A.,** Lam, S.D., Mohd Sidek, H. & Feroz, S.R. (2020). Pencirian interaksi steroid sapogenin, diosgenin dengan protein pengangkut manusia: teknik multispektroskopi dan molekul mengedok. *Malaysian Applied Biology Society Virtual Seminar 2020 (MSAB2020vs)*, pada 15 Disember 2020. **(PEMBENTANG LISAN).**
3. **Bakar, K.A.,** Lam, S.D. & Feroz, S.R. (2022). Interaction characteristics of mitragynine with human serum albumin and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *International Applied Biology Conference 2022 (IABC2022)*, pada 3–5 Jun 2022, bertempat di Hatten Hotel Melaka. **(PEMBENTANG LISAN).**
4. **Bakar, K.A.,** Lam, S.D. & Feroz, S.R. (2022). Interactions between mitragynine and human transport proteins by spectroscopic and molecular simulation studies. *2<sup>nd</sup> Applied Science Research International Conference 2022 (2<sup>nd</sup> ASRIC2022)*, pada 21 September 2022. **(PEMBENTANG POSTER : PEMENANG e-POSTER TERBAIK KATEGORI BIOLOGI).**
5. **Bakar, K.A.,** Lam, S.D., Low, C.F. & Feroz, S.R. (2023). Binding mechanism of mitragynine to  $\alpha_1$ -acid glycoprotein: Multi-spectroscopic and molecular modelling approaches. *1st Natural Science and Technology Conference (NaSTeC)*, pada 4–5 Oktober 2023, bertempat di The Waterfront Hotel Kuching, Sarawak. **(PEMBENTANG LISAN).**

6. **Bakar, K.A.**, Lam, S.D., Low, C.F. & Feroz, S.R. (2023). Exploring the interaction between the major psychoactive constituent of *Mitragyna Speciosa*, mitragynine and human serum albumin. *The National Biology Symposium 2023*, pada 6–7 Disember 2023, bertempat di Bangunan Kedekanan Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor. **(PEMBENTANG POSTER)**.
  
7. **Bakar, K.A.**, Ng, Y. H., Nazri, M.F., Muhamad, H.F., Subramaniam, T., Uithayakumar, R., Abdul Razar, A.N. & Feroz, N.A. (2024). Probing the interaction of labetalol hydrochloride with human serum albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: A biophysical point of view. *International Conference on Natural Sciences and Technologies 2024 (ICONAT 2024)*, pada 30 Mei–1 Jun 2024. **(PEMBENTANG POSTER)**.

