

Pencirian Interaksi antara Labetalol Hidroklorida dengan Albumin Serum Manusia dan Glikoprotein Asid- α_1

(Characterization of the Interaction between Labetalol Hydrochloride with Human Serum Albumin and Acid Glycoprotein- α_1)

KHAIRUL AZREENA BAKAR¹, NG YAN HONG¹, MUHAMMAD FIRDAUS NAZRI¹, HANISAH FATINI MUHAMAD¹, THARISHINI SUBRAMANIAM¹, ROSHALINI UITHAYAKUMAR¹, AIDA NABILA ABDUL RAZAR¹ & SHEVIN RIZAL FERROZ^{1,2,*}

¹*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

²*Structural Biology and Protein Engineering Research Group, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

Diserahkan 30 April 2024/Diterima 18 September 2024

ABSTRAK

Labetalol hidroklorida (LAH) adalah sejenis dadah antihipertensi perencat α - β yang digunakan dalam rawatan hipertensi jangka panjang. Keberkesanan dadah ini bergantung kepada pengikatannya dengan protein plasma yang mempengaruhi sifat farmakokinetiknya. Walau bagaimanapun, terdapat jurang penyelidikan dari segi profil pengikatan LAH dengan albumin serum manusia (HSA) dan glikoprotein asid- α_1 (AAG), dua protein plasma manusia yang utama. Oleh itu, penyelidikan ini telah dijalankan untuk mencirikan interaksi antara LAH dengan HSA dan AAG menggunakan kaedah multispektroskopi, mikroskopi dan analisis struktur. Perubahan pada spektrum penyerapan UV protein menunjukkan berlakunya pembentukan kompleks protein-LAH. Analisis data spektroskopi pendarfluor menunjukkan bahawa interaksi protein-LAH mempunyai keafinan yang sederhana dan adalah berbalik. Namun, LAH didapati mempunyai afiniti pengikatan yang lebih tinggi dengan AAG berbanding HSA. Seterusnya, hasil analisis mikroskop daya atom menunjukkan perbezaan morfologi dan dimensi protein setelah mengikat dengan LAH. Berdasarkan analisis struktur LAH dan simulasi dok molekul, pembentukan kompleks LAH-protein melibatkan beberapa jenis ikatan intermolekul seperti ikatan hidrogen, daya hidrofobik dan pelbagai interaksi sistem- π . Hasil kajian sesaran dadah kompetitif merumuskan bahawa tapak II dan I HSA adalah tapak pengikatan primer dan sekunder bagi LAH, berpadanan dengan hasil analisis dok molekul. Maklumat daripada kajian ini boleh dimanfaatkan dalam penghasilan dadah terbitan LAH yang lebih cekap dan selamat.

Kata kunci: Albumin serum manusia; glikoprotein asid- α_1 ; hipertensi; interaksi dadah - protein; labetalol hidroklorida

ABSTRACT

Labetalol hydrochloride (LAH) is a α - β blocker used in the long term treatment of hypertension. The efficacy of this drug depends on its binding to plasma proteins, which influences its pharmacokinetic properties. However, there is a significant research gap in understanding the binding profile of LAH with the major human transport proteins, human serum albumin (HSA) and α_1 -acid glycoprotein (AAG). Hence, this research was conducted to characterize the interaction of LAH with HSA and AAG using spectroscopic, microscopic, and structural analyses. Alterations in the UV absorption spectra of the proteins indicate the formation protein-LAH complexes. Fluorescence experiments showed moderate affinity and reversible binding between LAH and both proteins. However, LAH was found to interact more strongly with AAG compared to HSA. Furthermore, atomic force microscopic images showed differences in the morphology and dimensions of the proteins upon binding to LAH. Based on structural analysis of LAH and molecular docking results, the formation of the protein - LAH complexes involved various intermolecular forces including hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and several π -system interactions. Competitive drug displacement results suggested sites II and I as the primary and secondary binding sites of LAH on HSA, respectively, in general agreement with the docking simulations. The present findings may be valuable in the development of more effective and safer derivatives of LAH.

Keywords: α_1 -acid glycoprotein; drug-protein interaction; human serum albumin; hypertension; labetalol hydrochloride

PENGENALAN

Hipertensi merupakan faktor risiko utama bagi penyakit kardiovaskular dan dianggarkan hampir 50% kos rawatan bagi penyakit ini adalah berkaitan dengan dadah antihipertensi (Sharaf et al. 2021). Labetalol hidroklorida (LAH) merupakan salah satu dadah penghalang adrenoreseptor beta yang digunakan dalam rawatan antihipertensi (Omar et al. 2018). Kesan antihipertensifnya adalah disebabkan pengikatannya dengan reseptor adrenergik α_1 , β_1 dan β_2 yang mana ia bertindak sebagai antagonis kompetitif tidak selektif bagi adrenoreseptor β dan sebagai antagonis kompetitif selektif bagi adrenoreseptor α (Abdullah & Yusof 2019). Antara kesan tindakannya adalah pemvasokembangan salur darah, pengurangan output otot jantung dan penurunan degupan jantung (Webster, Webb & Chappell 2018). Di samping itu, LAH juga boleh menyebabkan hipotensi untuk mengurangkan pendarahan semasa pembedahan, selain digunakan sebagai anestesia (Salem 2017). Namun begitu, LAH diketahui menyebabkan beberapa kesan sampingan yang memudaratkan fungsi jantung apabila pengambilan dadah ini diberhentikan secara serta-merta. Lantaran itu, perlu dititikberatkan bahawa setiap individu mempunyai tindak balas yang berbeza terhadap agen antihipertensi (Shalihin, Harun & Osman 2020).

Albumin serum manusia (HSA) adalah protein plasma utama di dalam sistem peredaran manusia yang meliputi 60% daripada jumlah keseluruhan protein plasma. Ia berperanan sebagai pengangkut bagi pelbagai jenis sebatian endogen dan eksogen, terutamanya dadah berasid (Chen et al. 2021). HSA terdiri daripada rantai polipeptida tunggal yang mengandungi 585 residu asid amino dan mempunyai struktur tertier yang menyerupai bentuk jantung. Struktur protein ini terdiri daripada tiga domain homolog iaitu domain I, II dan III dengan setiap satu dibahagikan kepada dua subdomain, iaitu subdomain A dan B (Larsen et al. 2016). Terdapat tiga tapak pengikatan dadah utama pada HSA iaitu tapak I (tapak Sudlow I) yang terletak pada subdomain IIA, tapak II (tapak Sudlow II) pada subdomain IIIA dan tapak III pada subdomain IB. Ciri tapak I adalah tidak berkutub dan mempunyai keafinan tinggi terhadap sebatian heterosiklik, sementara tapak II mempunyai afiniti tinggi terhadap sebatian aromatik (Mishra & Heath 2021). Tapak III pula mempunyai sifat kefleksibelan yang tinggi dan mampu mengikat kepada pelbagai sebatian dengan struktur yang berbeza (Zsila 2013). Menariknya, HSA merupakan protein fasa akut negatif yang banyak digunakan sebagai biopenanda dalam pelbagai penyakit termasuklah hepatitis dan kegagalan buah pinggang kronik (Mohamed et al. 2022).

Glikoprotein asid- α_1 (AAG) atau dikenali sebagai orosomukoid, merupakan salah satu protein plasma daripada famili lipocalin yang juga berfungsi sebagai protein pengangkut bagi dadah berbes dan neutral

(Luo et al. 2015). Protein ini terdiri daripada 183 residu asid amino dengan dua ikatan dwisulfida dan mempunyai lima rantai N-glikan yang menyumbang kepada hampir 45% berat molekulnya (Elpek 2021). Terdapat dua jenis varian utama bagi protein ini iaitu varian F1*S dan varian A. Kedua-dua varian ini mempunyai perbezaan jujukan sebanyak 22 asid amino yang mempengaruhi selektiviti dalam pengikatan dadah (Luo et al. 2015). Fungsi biologi AAG yang lain adalah sebagai agen imunomodulasi dalam sistem imun manusia dan ia merupakan protein fasa akut positif dalam tindak balas terhadap keradangan, barah dan jangkitan (Lee et al. 2010).

Sifat farmakokinetik sesuatu dadah seperti bioketersediaan, taburan, metabolisme dan penyingkiran dipengaruhi oleh interaksinya dengan protein plasma yang bertanggungjawab dalam pengangkutan dadah tersebut ke seluruh badan. Ini seterusnya membawa kepada peningkatan efikasi terapeutik dadah, keterlarutan yang lebih baik, peningkatan separuh hayat *in vivo* di dalam plasma dan mengurangkan ketoksikan dadah (Russi et al. 2022). Oleh itu, keafinan pengikatan antara protein plasma dengan dadah adalah penting dalam memahami profil farmakologi dadah tersebut.

Maka dengan ini, kajian interaksi LAH dengan dua protein plasma utama manusia, HSA dan AAG dilakukan menggunakan pendekatan multispektroskopi, mikroskopi dan analisis struktur. Selain itu, kajian sesaran dadah kompetitif turut dilakukan bagi penentuan lokasi tapak pengikatan LAH menggunakan spektroskopi dikroisme membulat. Hasil daripada kajian ini dapat meningkatkan pemahaman mengenai interaksi LAH-protein, yang seterusnya mampu menyumbang kepada reka bentuk dadah berasaskan LAH yang baru.

BAHAN DAN KAEDAH

BAHAN

Serbuk kristal HSA (tanpa asid lemak, ketulenan $\geq 99\%$), AAG (ketulenan $\geq 99\%$), fenilbutazon (PBZ), diazepam (DZM), ketoprofen (KTN), bilirubin (BR), hemin (HMN) dan LAH (ketulenan $\geq 93\%$) diperolehi daripada Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Serbuk natrium fosfat monobes, serbuk natrium fosfat dwibes dan pelet natrium hidroksida diperolehi daripada Merck KGaA (Darmstadt, Jerman). Pelarut metanol (99%) dibekalkan oleh Chemiz Sdn. Bhd. (Shah Alam, Malaysia). Air tulen jenis II yang digunakan ditapis terlebih dahulu menggunakan penapis membran Durapore dengan liang bersaiz 0.1 μm daripada Merck Millipore Ltd.. Lapisan mika (berukuran 1.5 \times 1.5 cm dengan ketebalan 0.01 cm) yang digunakan bagi uji kaji mikroskopi daya atom diperolehi daripada Agar Scientific (Stansted Mountfitchet, England). Semua bahan kimia adalah bergred analitikal dan digunakan tanpa penulenan lanjutan.

PENYEDIAAN LARUTAN PROTEIN, LAH DAN LIGAN PENANDA

Larutan stok HSA dan AAG telah disediakan menggunakan larutan penimbal 10 mM natrium fosfat, pH 7.4. Kepekatan larutan protein telah ditentukan secara spektrofotometri dengan pekali pemupusan molar iaitu $35\,219\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pada 280 nm bagi HSA dan $38\,390\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pada 278 nm bagi AAG (Bakar et al. 2020; Zsila & Iwao 2007). Larutan stok LAH telah disediakan dengan melarutkan serbuk LAH dalam metanol, manakala larutan stok bagi PBZ, KTN dan DZM disediakan dengan melarutkan serbuk ligan penanda ini dalam etanol. Larutan stok HMN disediakan dengan melarutkan serbuk HMN dalam larutan 0.5 M natrium hidroksida (Ravindar et al. 2024). Larutan stok BR disediakan menggunakan larutan 0.5 M natrium hidroksida 0.5 M yang mengandungi 1 mM EDTA. Kemudian, kesemua larutan stok ligan penanda tersebut dicairkan kepada kepekatan 200 μM menggunakan larutan penimbal 10 mM natrium fosfat sebelum uji kaji dijalankan. Penentuan kepekatan larutan dilakukan secara spektrofotometri berdasarkan pekali pemupusan molar seperti berikut: $21\,050\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pada 265 nm bagi PBZ, $47\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pada 440 nm bagi BR (Bakar et al. 2020) dan $58\,440\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pada 385 nm bagi HMN (Abi-Khalil et al. 2015). Larutan stok BR dan HMN disediakan dengan pendedahan cahaya yang minimum dan digunakan dalam tempoh masa dua jam selepas disediakan bagi mengelakkan fotodegradasi berlaku (Feroz et al. 2013).

SPEKTROSKOPI PENYERAPAN UV-VIS

Uji kaji penyerapan UV-Vis telah dilakukan menggunakan spektrofotometer Shimadzu UV-1800 (Kyoto, Jepun) dengan kuvet kuartza dengan panjang lintasan 1 cm. Bagi mengesahkan pengkompleksan antara protein dan ligan, spektrum serapan sampel larutan protein–ligan telah dibandingkan dengan spektrum serapan yang didapati dengan mencampur nilai serapan bagi sampel protein bebas dan ligan bebas (protein + ligan) pada julat panjang gelombang 240 nm sehingga 320 nm. Bagi uji kaji melibatkan HSA, kepekatan protein ditetapkan pada 12 μM dan kepekatan LAH adalah 3, 6, 9 dan 12 μM . Manakala bagi uji kaji melibatkan AAG, kepekatan protein ialah 10 μM dan kepekatan LAH 4, 8 dan 10 μM .

Bagi pembetulan kesan turasan dalaman, pengukuran serapan sampel protein dengan dan tanpa LAH dijalankan pada panjang gelombang 220 – 550 nm. Kepekatan protein ditetapkan pada 3 μM , manakala kepekatan LAH pula adalah meningkat dari 3 – 30 μM .

SPEKTROSKOPI PNDARFLUOR

Uji kaji spektroskopi pendarfluor dilakukan dengan menggunakan spektrometer pendarfluor Agilent Cary Eclipse (Santa Clara, CA, USA) yang dilengkapi pancaran cahaya xenon dengan kuvet kuartza dengan panjang

lintasan 1 cm. Uji kaji ini dilakukan pada suhu 25 °C dengan kelajuan imbasan 600 nm min⁻¹ dan sensitiviti PMT pada 600 V. Pengukuran spektrum pendarfluor larutan protein (3 μM) tanpa dan dengan kehadiran LAH (3–30 μM , selang 3 μM setiap sampel) dicatatkan pada panjang gelombang pancaran 300 nm hingga 600 nm selepas pengujaan pada 280 dan 295 nm. Kesemua spektrum pendarfluor yang diperoleh diratakan menggunakan algoritma Savitzky–Golay dengan saiz konvolusi sebanyak 25. Pengukuran spektrum pendarfluor LAH bebas (3–30 μM) dan larutan penimbal juga dilakukan dengan tetapan yang sama.

KEAFINAN PENGIKATAN PROTEIN–LIGAN

Kesan turasan dalaman dalam pengukuran spektroskopi pendarfluor merujuk kepada penyerapan yang signifikan pada panjang gelombang pengujaan dan pancaran oleh komponen dalam larutan sampel (Bakar & Feroz 2019). Maka, pembetulan data yang diperoleh dilakukan menggunakan persamaan berikut:

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} \times 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}/2)} \quad (1)$$

dengan F_{cor} dan F_{obs} adalah nilai pendarfluor yang dibetulkan dan yang direkod, manakala A_{ex} dan A_{em} merujuk kepada nilai perubahan penyerapan sampel setelah penambahan LAH pada panjang gelombang pengujaan dan pancaran, masing-masing. Bacaan spektrum pendarfluor yang telah dibetulkan ini kemudiannya turut ditolak dengan spektrum pendarfluor LAH bebas. Setelah itu, keafinan pengikatan dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan berikut:

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

dengan F dan F_0 adalah nilai pendarfluor protein dengan dan tanpa kehadiran ligan; F_c ialah nilai pendarfluor protein dalam keadaan tepu; K_d ialah pemalar disosiasi ($K_a = 1/K_d$); $[L]_a$ ialah kepekatan ligan yang ditambah; dan $[P]_t$ ialah kepekatan protein. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan perisian GraphPad Prism 9.3.1 (pemadanan lengkung tak linear dengan model pengikatan satu tapak khusus) untuk mendapat nilai K_a .

MIKROSKOPI DAYA ATOM (AFM)

Mikroskop daya atom (AFM) daripada Park Systems Corporation (Suwon, Korea) digunakan untuk mencirikan perubahan topografi permukaan protein HSA dan AAG akibat interaksi dengan LAH (Aryanto et al. 2010). Sampel bagi AFM disediakan dengan melekatkan kepingan mika berukuran 1 cm × 1 cm ke atas slaid kaca. Larutan protein bebas (1.5 μM) dan larutan kompleks protein–ligan (1:1) telah disediakan. Sebanyak 30 μL sampel dititiskan di atas permukaan kepingan mika dan kemudiannya dieram selama 15 minit. Sampel tersebut kemudiannya dibasuh

dengan menggunakan air tulen untuk menyingkirkan molekul yang mengikat longgar pada mika sebelum diinkubasi semalaman dan dianalisis. Imej 2-D dan 3-D sampel telah diperoleh melalui perisian XEI versi 4.3.4 dengan saiz imbasan $2.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$.

ANALISIS STRUKTUR LAH

Analisis struktur LAH dilakukan menggunakan perisian ChemAxon Discovery Toolkit (Chemicalize) untuk mendapatkan maklumat fizikokimia LAH seperti penderma dan penerima ikatan hidrogen, keterlarutan, nilai logP, nilai logD serta cas. Berdasarkan maklumat tersebut, daya intermolekul yang wujud antara LAH dengan protein HSA dan AAG dapat diramalkan.

SESARAN DADAH KOMPETITIF

Kajian sesaran dadah kompetitif dijalankan dengan menggunakan PBZ, DZM, KTN, HMN dan BR sebagai ligan penanda untuk menentukan tapak pengikatan LAH pada HSA. Campuran ligan penanda-HSA telah dieram terlebih dahulu selama 20 minit sebelum penambahan LAH. Kemudian, sampel dieram semula selama 30 minit pada 25°C sebelum dibaca menggunakan spektroskopi dikroisme membulat (CD). Spektropolarimeter Jasco J-815 (Tokyo, Jepun) telah digunakan bagi merekod isyarat CD di bawah aliran nitrogen yang berterusan menggunakan kuvet dengan panjang lintasan 1 cm pada suhu 25°C . Spektra CD bagi setiap sampel diperoleh pada kelajuan pengimbasan 100 nm min^{-1} dengan tempoh tindak balas 1 s.

Penyesaran PBZ oleh LAH dikaji dengan merekod isyarat CD kompleks PBZ-HSA ($10 \mu\text{M}$ PBZ + $10 \mu\text{M}$ HSA) pada panjang gelombang 250–310 nm sebelum dan selepas penambahan LAH ($0\text{--}50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$). Penyesaran DZM oleh LAH dikaji dengan merekod isyarat CD kompleks DZM-HSA ($10 \mu\text{M}$ DZM + $10 \mu\text{M}$ HSA) pada panjang gelombang 250–350 nm sebelum dan selepas penambahan LAH ($0\text{--}50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$). Penyesaran KTN oleh LAH dikaji dengan merekod isyarat CD kompleks KTN-HSA ($20 \mu\text{M}$ KTN + $20 \mu\text{M}$ HSA) pada panjang gelombang 300–400 nm sebelum dan selepas penambahan LAH ($0\text{--}100 \mu\text{M}$ dengan selang $20 \mu\text{M}$). Penyesaran HMN oleh LAH dikaji dengan merekod isyarat CD kompleks HMN-HSA ($10 \mu\text{M}$ DZM + $10 \mu\text{M}$ HSA) pada panjang gelombang 300–500 nm sebelum dan selepas penambahan LAH ($0\text{--}50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$). Penyesaran BR oleh LAH dikaji dengan merekod isyarat CD kompleks BR-HSA ($10 \mu\text{M}$ DZM + $10 \mu\text{M}$ HSA) pada panjang gelombang 350 – 500 nm sebelum dan selepas penambahan LAH ($0\text{--}50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$).

SIMULASI DOK MOLEKUL

Simulasi dok molekul antara LAH dengan protein HSA dan AAG telah dilakukan menggunakan perisian

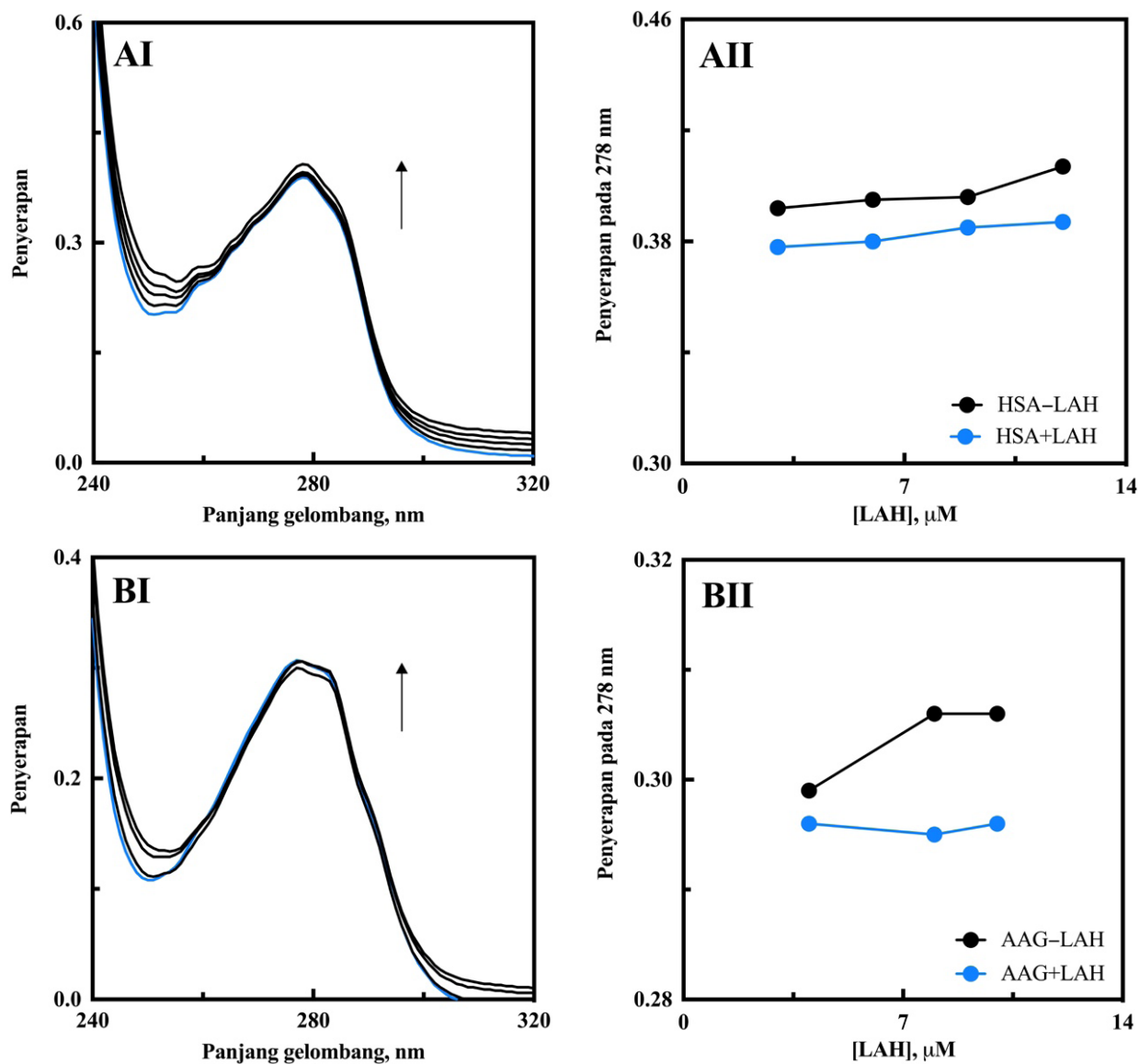
AutoDockTools 1.5.7 dan AutoDock4.2 (Morris et al. 2009). Konformer protein diperoleh daripada Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>), manakala struktur 3D LAH yang diperoleh daripada PubChem (CID: 3869) dalam format SDF ditukar kepada format PDB menggunakan perisian UCSF Chimera 1.16.1 (Pettersen et al. 2004). Struktur LAH kemudiannya dioptimumkan menggunakan perisian Chem3D melalui kaedah peminimuman tenaga menggunakan medan daya MMFF94 (Halgren 1999). Bagi struktur kristal protein, beberapa langkah persediaan telah dijalankan, termasuk penyingkiran ligan dan molekul air serta penambahan hidrogen berkutub dan cas atom separa bersatu Kollman. Penyediaan struktur LAH pula melibatkan beberapa langkah termasuk penetapan ikatan berputar, penggabungan hidrogen tidak berkutub dan pengiraan cas Gasteiger.

Struktur kristal HSA dengan resolusi 2.5 \AA (PDB ID: 1BM0) telah digunakan bagi prosedur dok molekul. Dua tapak pengikatan ligan pada subdomain IIA (tapak I) dan IIIA (tapak II) telah ditakrifkan menggunakan grid berukuran $70 \times 70 \times 70 \text{ \AA}$ dengan jarak grid 0.375 \AA . Grid ini dipusatkan pada koordinat $x = 35.26$, $y = 32.41$ dan $z = 36.46$ untuk tapak I, serta $x = 14.42$, $y = 23.55$ dan $z = 23.31$ untuk tapak II. Bagi AAG, dua struktur kristal berbeza telah digunakan, iaitu varian F1*S (PDB ID: 3KQ0, resolusi 1.8 \AA) dan varian A (PDB ID: 3APU, resolusi 2.1 \AA). Koordinat kotak grid telah ditentukan sebagai $x = 21.242$, $y = -3.094$ dan $z = 2.081$ (jarak grid 0.408 \AA) untuk struktur 3KQ0, serta $x = 11.194$, $y = 1.306$ dan $z = 29.976$ (jarak grid 0.708 \AA) untuk struktur 3APU.

Bagi analisis pasca dok, konformasi dok dengan tenaga pengikatan terendah telah divisualisasi dan dipilih untuk analisis selanjutnya yang melibatkan penentuan jenis interaksi intermolekul menggunakan perisian BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5.

HASIL DAN PERBINCANGAN

PENGESAHAN PEMBENTUKAN KOMPLEKS PROTEIN-LAH Uji kaji penyerapan UV dijalankan bagi mengesahkan pembentukan kompleks protein dengan LAH dengan membandingkan penyerapan protein dengan kehadiran LAH (protein-LAH) dengan campuran nilai penyerapan protein bebas dan LAH bebas (protein+LAH) pada panjang gelombang 240 nm sehingga 320 nm. Hasil menunjukkan spektrum penyerapan bagi sampel HSA-LAH (Rajah 1(AI)) dan AAG-LAH (Rajah 1(BI)) adalah berkadar terus dengan kepekatan LAH. Puncak penyerapan pada 278 nm adalah disebabkan oleh kewujudan asid amino triptofan dan tirosin pada struktur HSA dan AAG (Asngari et al. 2024). Nilai penyerapan bagi sampel protein-LAH ini adalah lebih tinggi daripada jumlah campuran nilai penyerapan protein bebas dan LAH bebas pada kesemua kepekatan ligan (Rajah 1(AII) dan 1(BII)), masing-masing bagi HSA dan AAG). Ini jelas menunjukkan bahawa berlakunya



RAJAH 1. Profil penyerapan (A) HSA dan (B) AAG tanpa dan dengan kehadiran LAH. (I) Spektrum penyerapan protein tanpa (garisan biru) dan dengan penambahan LAH yang berkepekatan semakin meningkat. (II) Perbezaan penyerapan pada 278 nm bagi larutan protein-LAH dengan campuran nilai penyerapan protein bebas dan LAH bebas (protein+LAH). [HSA] = 12 μM dengan [LAH] = 3, 6, 9 dan 12 μM . [AAG] = 10 μM dengan [LAH] = 4,8 dan 10 μM

perubahan mikropsekitaran fluorofor pada kedua-dua protein akibat pengikatan dengan LAH dan membuktikan pembentukan kompleks HSA-LAH dan AAG-LAH. Sekiranya HSA dan AAG tidak berinteraksi dengan LAH, nilai penyerapan bagi protein-LAH dan protein+LAH tidak akan menunjukkan sebarang perbezaan.

PENENTUAN KEAFINAN PENGIKATAN PROTEIN-LAH

Penentuan keafinan bagi interaksi antara LAH dengan HSA dan AAG telah dilakukan menggunakan kaedah spektroskopi pendarfluor. Penyumbang utama pendarfluor intrinsik sesuatu protein adalah kehadiran residu Trp di dalam jujukan protein tersebut (Lee et al. 2017). Maka, uji kaji ini telah dilakukan dengan menganalisis perubahan isyarat keamatan pendarfluor HSA dan AAG selepas penambahan LAH pada panjang gelombang pancaran 320–440 nm setelah pengujaan pada 280 dan 295 nm yang dipilih khusus untuk residu Trp.

Sampel LAH bebas menghasilkan isyarat pendafluor dengan puncak pancaran pada 419 nm (Rajah 2(A)) dan juga mempunyai penyerapan yang signifikan dalam julat panjang gelombang 270–370 nm dengan puncak pada 320 nm (Rajah 2(B)). Oleh itu, data keamatan pendarfluor bagi kompleks protein-LAH perlu ditolak dengan nilai pendarfluor LAH bebas dan dibetulkan bagi kesan turasan dalaman untuk mendapatkan bacaan yang tepat. Pemelindapan isyarat pendarfluor HSA (Rajah 2(C)) dan AAG (Rajah 2(D)) dapat dikesan setelah penambahan LAH (0–30 μM). Spektrum pendarfluor HSA menghasilkan puncak pancaran pada 341 nm yang disumbangkan oleh residu Trp-214 di subdomain IIA (Feroz et al. 2013), manakala AAG menghasilkan puncak pancaran pada 337 nm yang disumbangkan oleh residu Trp-25 (AlAjmi et al. 2020). Kedua-dua protein ini memerlukan 10 kali kepekatan LAH untuk mencapai ketepuan. Menariknya, penurunan keamatan pendarfluor bagi AAG adalah jauh lebih tinggi (25.5%) berbanding HSA (3.4%). Pemelindapan pendarfluor akibat pengikatan LAH ini adalah disebabkan oleh pergerakan fluorofor protein yang lebih terdedah kepada pelarut (Affandi et al. 2017). Spektrum pancaran maksimum bagi AAG didapati masih kekal sama tanpa sebarang anjakan, namun HSA menunjukkan anjakan biru yang kecil (341→338 nm) kesan daripada perubahan mikropsekitaran protein selepas berinteraksi dengan LAH.

Seterusnya, data pendafluor yang dibetulkan dianalisis menggunakan persamaan (2) untuk memperoleh nilai pemalar asosiasi (K_a), iaitu $(7.5 \pm 3.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ dan $(9.19 \pm 5.57) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ masing-masing bagi pengikatan LAH dengan HSA dan AAG. Nilai K_a ini menunjukkan keafinan pengikatan yang sederhana dan berada dalam julat 10^3 hingga 10^6 M^{-1} bagi pengikatan protein-dadah yang ideal (Tayyab & Feroz 2021). Ini kerana tahap keafinan ini adalah sesuai bagi pengikatan LAH secara berbalik dengan protein pengangkut di dalam sistem peredaran yang membolehkan

LAH mengikat pada reseptor sasarannya selepas disosiasi daripada protein.

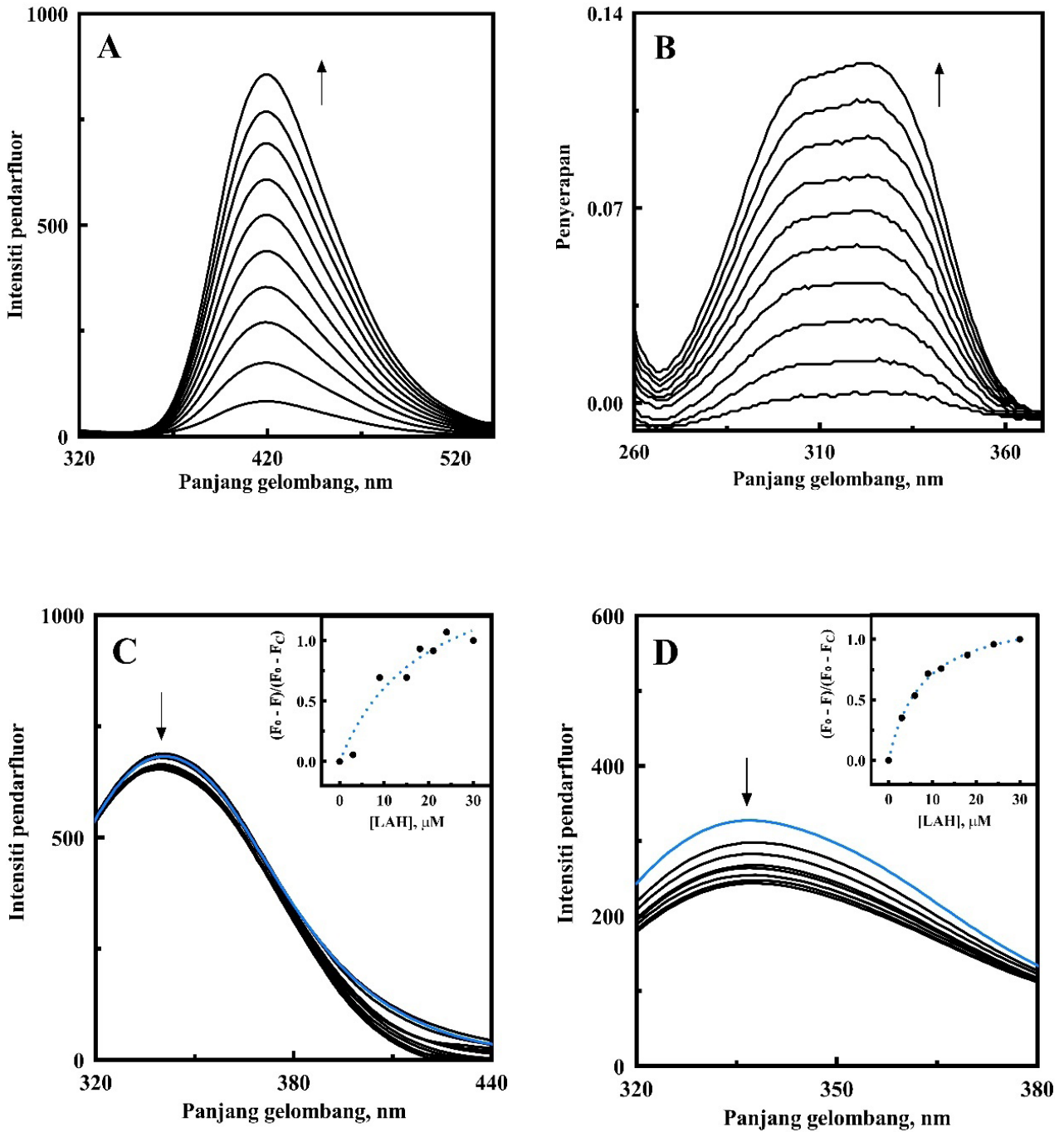
IMBASAN TOPOLOGI KOMPLEKS PROTEIN-LAH

Analisis AFM boleh dilakukan bagi mengkaji perubahan morfologi dan struktur permukaan protein selepas penambahan ligan (Asngari et al. 2024). Dalam kajian ini, sampel HSA dan AAG bebas serta kompleks mereka dengan LAH yang terjerap pada plat mika telah diimbab untuk menganalisis perubahan topologi protein (Rajah 3). Berdasarkan Rajah 3(A), saiz molekul HSA bebas adalah sekitar 4 nm yang menyerupai keputusan kajian lepas yang melaporkan ketinggian HSA bebas sebagai $(5 \pm 2.84) \text{ nm}$ (Gao et al. 2010). Ketinggian kompleks HSA-LAH pula adalah lebih besar iaitu sekitar 12 nm, ini menunjukkan bahawa perubahan struktur protein selepas pengikatan dengan LAH mendorong kepada agregasi protein (Rajah 3(B)). Bagi AAG (Rajah 3(C) dan 3(D)), ketinggian protein natif ini adalah sekitar 2 nm yang hanya sedikit kecil berbanding kompleksnya dengan LAH (3 nm). Pengkompleksan LAH pada AAG mengakibatkan dimensi protein secara purata menjadi lebih lebar (0.42 μm) berbanding dengan AAG bebas (0.33 μm). Selain itu, kepadatan topografi AAG bebas adalah lebih tinggi berbanding dengan kompleks LAH-AAG yang agak jarang. Kesimpulannya, kedua-dua HSA dan AAG mengalami agregasi melalui interaksi hidrofobik setelah mengikat kepada LAH yang menyebabkan struktur protein menjadi lebih terbuka, seperti yang diperhatikan dalam kajian lepas (Gao et al. 2010).

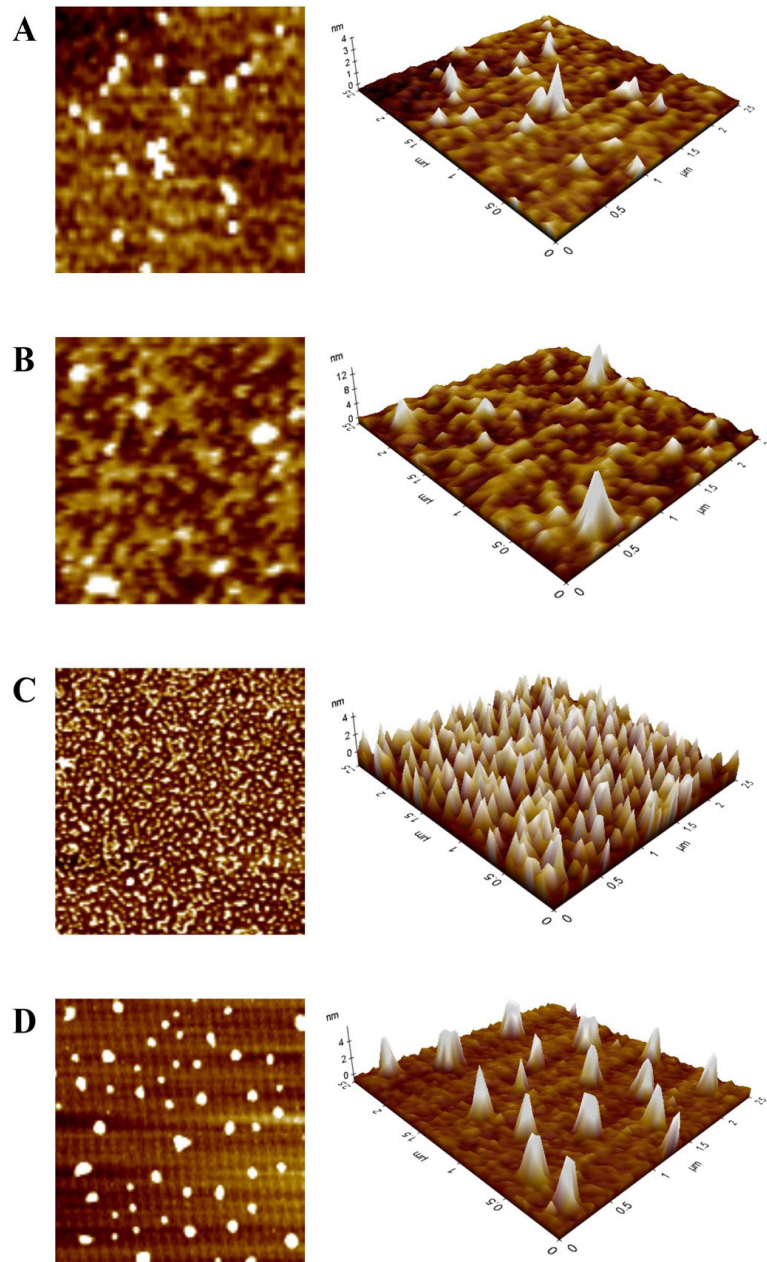
PENGENALPASTIAN DAYA INTERMOLEKUL DALAM INTERAKSI PROTEIN-LAH

Hasil analisis struktur molekul menggunakan *ChemAxon Discovery Toolkit – Chemicalize* membolehkan peramalan daya intermolekul yang terlibat dalam interaksi antara molekul tersebut dengan protein. Antara maklumat penting yang diperoleh adalah parameter yang terdapat dalam peraturan lima Lipinski. Peraturan ini dikaitkan dengan sifat farmakokinetik sesuatu dadah yang meliputi proses penyerapan, penyebaran, metabolisme dan perkumuhan (Ekawati et al. 2022). Melalui analisis ini, LAH telah dikenal pasti sebagai sesuai untuk dijadikan dadah oral kerana ia mematuhi keseluruhan peraturan lima Lipinski (Jadual 1). Sebatian LAH dijangka boleh berinteraksi dengan protein plasma melalui ikatan hidrogen kerana mempunyai empat penderma dan penerima ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen merupakan interaksi yang melibatkan atom hidrogen dengan atom yang lain yang mempunyai elektronegativiti yang tinggi dan adalah sejenis ikatan bukan kovalen yang kuat (Zainal et al. 2018) dan sering terlibat dalam interaksi protein-dadah.

Selain itu, nilai logP yang merupakan petunjuk kelipofilikan sesuatu sebatian bagi LAH ialah 1.887 (Jadual 1). Pekali logP dikaitkan dengan pekali logD dan



RAJAH 2. (A) Keamatan pendarfluor dan (B) penyerapan LAH bebas (3–30 μM , dengan selang 3 μM). Pemelindapan pendarfluor (C) HSA dan (D) AAG setelah penambahan LAH dengan kepekatan semakin meningkat. Garisan biru mewakili spektrum protein bebas. [Protein] = 3 μM , [LAH] = 3, 6, 9, 12, 18, 24 dan 30 μM . Panjang gelombang pengujian bagi HSA dan AAG adalah 280 nm dan 295 nm



RAJAH 3. Imej topografi AFM 2-D dan 3-D bagi sampel (A) 1.5 μM HSA, (B) kompleks HSA-LAH (1:1), (C) 1.5 μM AAG dan (D) kompleks AAG-LAH (1:1) yang terjerap pada permukaan lapisan mika. Saiz imbasan: 2.5 μM \times 2.5 μM

JADUAL 1. Ciri sebatian LAH berdasarkan peraturan lima Lipinski

Parameter	Nilai bagi LAH	Nilai rujukan
Penderma ikatan hidrogen	4	≤ 5
Penerima ikatan hidrogen	4	≤ 10
Jisim molekul (Da)	364.16	≤ 500
LogP	1.887	≤ 5
Pembiasan molar (cm^3/mol)	94.72	40 – 130

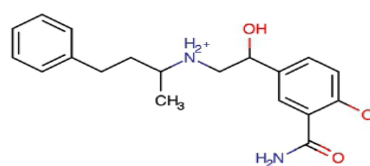
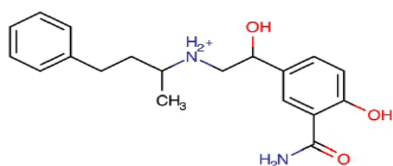
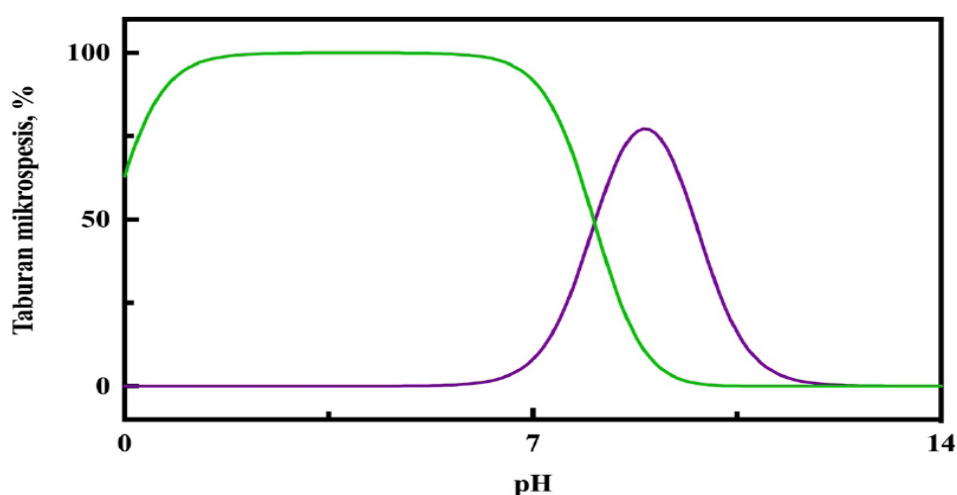
logD digunakan untuk sebatian lipofilik terionisasi yang bergantung kepada pH (Bhal et al. 2007). Nilai logD bagi LAH pada pH fisiologi adalah 1.258. Ini menunjukkan bahawa LAH adalah tidak berkutub dan boleh membentuk interaksi hidrofobik apabila mengikat dengan protein di dalam plasma. Secara umumnya, HSA didapati berinteraksi dengan sangat baik dengan sebatian yang mempunyai gegelung aromatik melalui ikatan hidrofobik (Dos Santos et al. 2019). Beberapa kajian lepas juga merumuskan bahawa AAG juga mampu mengangkut molekul hidrofobik walaupun hanya memiliki satu tapak pengikatan ligan utama (Luo et al. 2015). Hal ini menyokong andaian bahawa interaksi hidrofobik merupakan salah satu daya yang terlibat dalam pengikatan LAH kepada HSA dan AAG.

Rajah 4 menunjukkan bahawa terdapat dua mikrospecies utama LAH yang wujud pada pH 7.4, iaitu mikrospecies 1 yang bercas positif (taburan: 81.6%) dan mikrospecies 2 yang wujud dalam keadaan zwitterion

(taburan: 17.9%). Kehadiran kedua-dua mikrospecies LAH ini memberi LAH cas keseluruhan sebanyak 0.81 pada pH 7.4. Pada pH ini, HSA dan AAG didapati bercas negatif memandangkan titik isoelektrik bagi HSA adalah sekitar 4.7 hingga 5 (Vlasova & Saletsky 2009) dan titik isoelektrik bagi AAG adalah antara julat 2.7 hingga 3.2 (Ruiz 2021). Maka, sebatian LAH yang berlawanan cas dengan HSA dan AAG diramalkan akan membentuk ikatan ion dengan kedua-dua protein ini. Secara kesimpulannya, pembentukan ikatan hidrogen, hidrofobik dan ion diramal menyumbang kepada kestabilan kompleks HSA-LAH dan AAG-LAH.

PENENTUAN TAPAK PENGIKATAN LAH PADA HSA

Kajian sesaran dadah kompetitif telah dijalankan bagi menentukan tapak pengikatan LAH pada HSA menggunakan ligan penanda yang mengikat secara khusus pada tapak pengikatan tertentu. Ligan penanda yang



RAJAH 4. Lengkok taburan mikrospecies LAH melawan pH serta struktur mikrospecies LAH yang wujud pada pH 7.4. Mikrospecies 1 (hijau) bercas positif manakala mikrospecies 2 (ungu) wujud dalam bentuk zwitterion

digunakan adalah PBZ bagi tapak I, DZM dan KTN bagi tapak II, serta BR dan HMN bagi tapak III.

Berdasarkan Rajah 5(A), kompleks PBZ-HSA menunjukkan spektrum CD yang mempunyai dua maksimum pada 289 nm dan 256 nm (Bertoza et al. 2018). Penambahan LAH kepada kompleks PBZ-HSA telah menyebabkan penurunan isyarat CD pada 289 nm sebanyak 57% pada nisbah molar 5:1 bagi LAH/HSA. Pemerhatian ini menunjukkan berlakunya penyesaran PBZ daripada HSA oleh LAH yang membuktikan bahawa LAH mampu mengikat pada tapak I HSA.

Spektrum CD bagi kompleks DZM-HSA (Rajah 5(B)) menunjukkan dua maksimum pada 259 nm dan 289 nm, serta dua minimum pada 273 nm dan 319 nm (Nozaki et al. 2009). Puncak maksimum pada 259 nm mempunyai magnitud yang lebih tinggi berbanding maksimum pada 289 nm. Penambahan LAH berkepekatan meningkat kepada kompleks DZM-HSA telah menghasilkan pengurangan isyarat CD yang ketara pada maksimum 259 nm sebanyak 72% pada nisbah molar 5:1 bagi LAH/HSA, seterusnya membuktikan bahawa LAH dapat menyasarkan DZM dengan kuat daripada tapak II HSA. Selain itu, ligan penanda KTN juga digunakan bagi mengkaji penyesaran pada tapak ini. Berdasarkan Rajah 5(C), kompleks KTN-HSA menunjukkan satu minimum pada spektrum CD pada panjang gelombang 340 nm (Gotti et al. 2003). Spektrum CD kompleks KTN-HSA turut menunjukkan perubahan pada isyarat CD selepas penambahan LAH. Justeru, hal ini membuktikan bahawa penyesaran ligan penanda KTN oleh LAH telah berlaku. Namun begitu, isyarat CD yang bertindih serta penurunan nilai relatif CD pada 340 nm yang rendah (22%) adalah disebabkan kestabilan ligan penanda KTN yang rendah.

Penentuan pengikatan LAH pada tapak III pula dilakukan dengan menggunakan ligan HMN dan BR. Pengikatan HMN pada HSA menghasilkan satu minimum pada 395 nm seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 5(D) (Goncharova et al. 2015). Spektrum CD kompleks HMN-HSA menunjukkan bahawa tiada langsung perubahan magnitud yang berlaku walaupun LAH ditambah pada kepekatan sehingga 50 μ M. Maka, tiada perubahan nilai relatif CD_{396 nm} diperhatikan. Ini menunjukkan bahawa LAH tidak dapat menyasarkan HMN daripada HSA dan HMN kekal terikat pada HSA. Pemerhatian ini disokong oleh uji kaji menggunakan ligan penanda BR (Rajah 5(D)). Spektrum CD mempamerkan satu maksimum pada 459 nm dan satu minimum pada 407 nm apabila BR mengikat pada HSA (Trynda-Lemiesz 2004). Sekali lagi, spektrum CD ini tidak mengalami perubahan dari segi bentuk dan magnitud walaupun terdapat penambahan LAH sehingga 50 μ M. Ini menunjukkan bahawa tiada penyesaran berlaku dan BR masih terikat pada HSA.

Secara keseluruhannya, penyesaran ligan penanda oleh LAH diperhatikan hanya berlaku pada tapak I dan II HSA. Pengikatan LAH yang selektif pada kedua-dua tapak ini adalah disebabkan oleh struktur kimia LAH

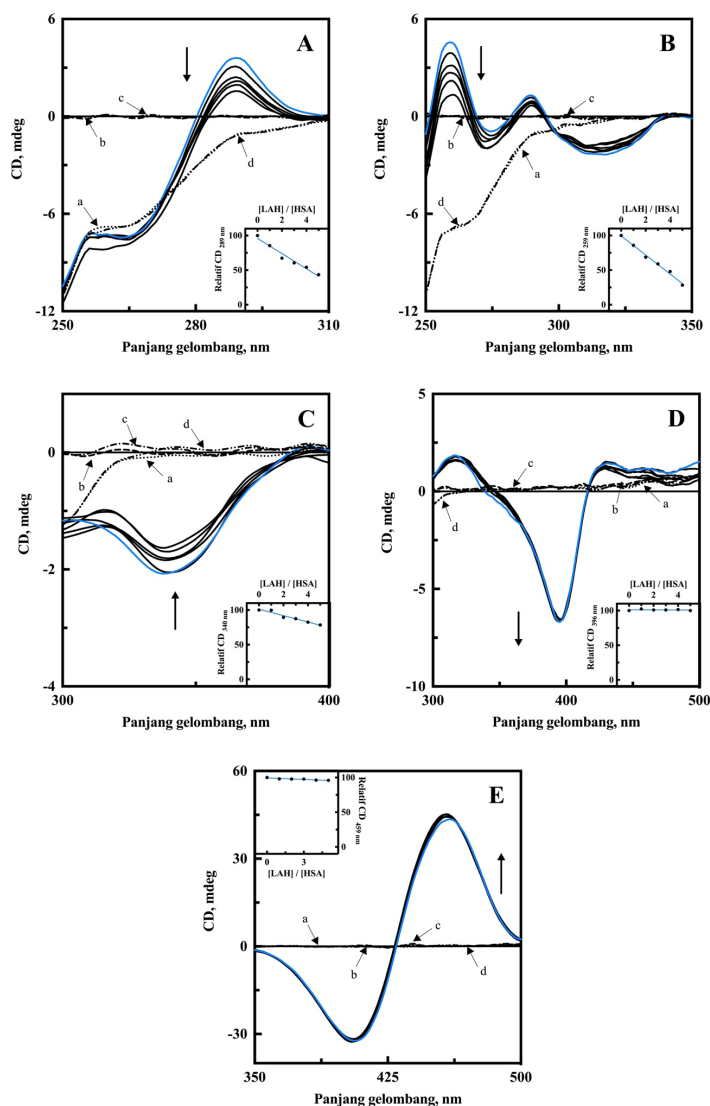
yang merupakan terbitan salisilamida yang mempunyai kumpulan fenol hidroksil dan kumpulan amida (Elhefnawy & Elabd 2018). Hal ini kerana tapak II mempunyai afiniti tinggi kepada sebatian asid karboksilik aromatik (Zsila 2013; Zsila et al. 2011). Meskipun struktur LAH tidak unggul untuk mengikat pada tapak I, LAH masih mampu mengikat pada tapak tersebut kerana kawasan tapak I adalah besar, fleksibel dan mempunyai stereoselektiviti yang rendah (Otagiri 2005). Berdasarkan perbandingan peratusan penurunan nilai relatif CD dengan nisbah molar LAH/HSA, dapat dirumuskan bahawa tapak II HSA adalah tapak pengikatan primer bagi LAH manakala tapak I berfungsi sebagai tapak sekunder.

ANALISIS DOK MOLEKUL

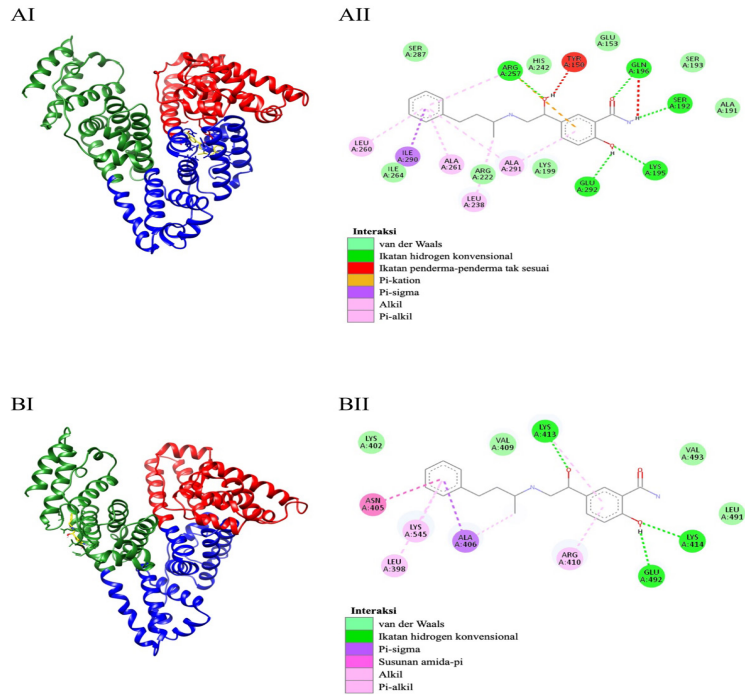
Simulasi dok molekul telah dilakukan bagi menjelaskan mod interaksi antara LAH dengan protein HSA dan AAG pada peringkat atom dengan terperinci. Berikutan hasil kajian sesaran dadah yang mendapati bahawa LAH mengikat pada tapak I and II HSA, simulasi dok LAH dengan HSA juga dijalankan secara khusus terhadap dua tapak ini. Bagi AAG pula, kawasan dok merangkumi keseluruhan saku pengikatan tunggal pusat protein tersebut (untuk kedua-dua varian F1*S dan A).

Rajah 6(AI) dan 6(BI) menunjukkan visualisasi konformasi LAH yang paling stabil pada tapak I dan II HSA. Jika dinilai hanya berdasarkan tenaga pengikatan yang diperolehi, interaksi LAH adalah lebih kuat pada tapak I (-8.66 kcal/mol) berbanding tapak II (-7.18 kcal/mol). Walaupun perbandingan profil daya intermolekul LAH-HSA menunjukkan pengikatan LAH di tapak I (Rajah 6(AII)) mempunyai jumlah interaksi yang lebih banyak, terutamanya ikatan hidrogen, terdapat dua interaksi penderma tak sesuai antara LAH dan residu asid amino pada tapak ini yang melibatkan Gln-196 dan Tyr-150. Kewujudan interaksi ini dipercayai mengurangkan kestabilan pengkompleksan LAH pada tapak I, selari dengan kesimpulan daripada uji kaji sesaran dadah bahawa tapak ini adalah tapak pengikatan sekunder LAH pada HSA. Sebaliknya, persekitaran di tapak II adalah lebih optimal bagi pengikatan LAH yang disumbangkan oleh kehadiran pelbagai jenis daya intermolekul, khususnya interaksi bersifat hidrofobik (Rajah 6(BII)). Menariknya, susunan π -amida antara LAH dan HSA yang melibatkan residu Asn-405 hanya diperhatikan pada tapak II, manakala interaksi π -kation (Arg-257) pula hanya wujud pada tapak I.

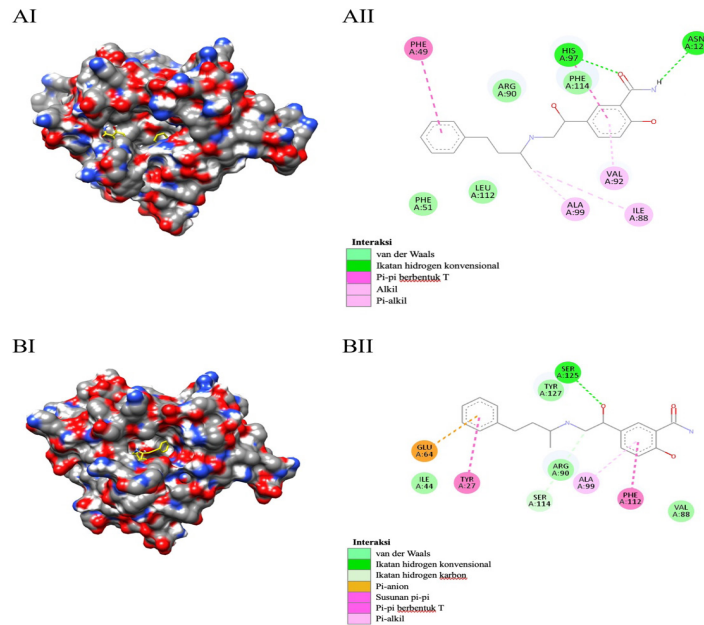
Hasil simulasi dok molekul dengan AAG pula mendapati LAH memasuki saku pengikatan pusat protein dengan tenaga pengikatan sebanyak -9.30 kcal/mol bagi varian F1*S (Rajah 7(AI)) dan -7.43 kcal/mol bagi varian A (Rajah 7(BI)). Kestabilan pengkompleksan LAH yang lebih tinggi dengan AAG varian F1*S berkemungkinan adalah disebabkan oleh kehadiran dua ikatan hidrogen konvensional melibatkan His-97 (panjang ikatan = 3.15 Å) dan Asn-121 (panjang ikatan = 2.46 Å), berbanding hanya



RAJAH 5. Penyesaran ligan penanda daripada HSA oleh LAH pada tapak pengikatan yang berbeza. (A) Spektrum CD kompleks PBZ-HSA ($10 \mu\text{M}$ masing-masing) tanpa (garisan biru) dan dengan kehadiran kepekatan LAH yang meningkat ($0-50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$). Spektrum dilabel 'a', 'b', 'c' dan 'd' menunjukkan $10 \mu\text{M}$ HSA, $10 \mu\text{M}$ PBZ, $50 \mu\text{M}$ LAH dan kompleks HSA-LAH (1:5). (B) Spektrum CD kompleks DZM-HSA ($10 \mu\text{M}$ masing-masing) tanpa (garisan biru) dan dengan kepekatan LAH yang meningkat ($0-50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$). Spektrum dilabel 'a', 'b', 'c' dan 'd' menunjukkan $10 \mu\text{M}$ HSA, $10 \mu\text{M}$ DZM, $50 \mu\text{M}$ LAH dan kompleks HSA-LAH (1:5). (C) Spektrum CD kompleks KTN-HSA ($20 \mu\text{M}$ masing-masing) tanpa (garisan biru) dan dengan kehadiran kepekatan LAH yang meningkat ($0-100 \mu\text{M}$ dengan selang $20 \mu\text{M}$). Spektrum dilabel 'a', 'b', 'c' dan 'd' menunjukkan $20 \mu\text{M}$ HSA, $20 \mu\text{M}$ KTN, $100 \mu\text{M}$ LAH dan kompleks HSA-LAH (1:5). (D) Spektrum CD kompleks HMN-HSA ($10 \mu\text{M}$ masing-masing) tanpa (garisan biru) dan dengan kehadiran kepekatan LAH yang meningkat ($0-50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$). Spektrum dilabel 'a', 'b', 'c' dan 'd' menunjukkan $10 \mu\text{M}$ HSA, $10 \mu\text{M}$ HMN, $50 \mu\text{M}$ LAH dan kompleks HSA-LAH (1:5). (E) Spektrum CD kompleks BR-HSA ($10 \mu\text{M}$ masing-masing) tanpa dan dengan kehadiran kepekatan LAH yang meningkat ($0-50 \mu\text{M}$ dengan selang $10 \mu\text{M}$). Spektrum dilabel 'a', 'b', 'c' dan 'd' menunjukkan $10 \mu\text{M}$ HSA, $10 \mu\text{M}$ BR, $50 \mu\text{M}$ LAH dan kompleks HSA-LAH (1:5)



RAJAH 6. Model dok molekul bagi interaksi LAH dengan protein HSA pada (A) tapak I di subdomain IIA dan (B) tapak II di subdomain IIIA. (I) Orientasi pengikatan bagi konformasi LAH yang paling stabil (berwarna kuning) pada HSA. Setiap domain HSA diwarnakan mengikut berbeza warna; I: merah, II: biru dan III: hijau. (II) Gambaran skematik daya intermolekul yang terlibat dalam interaksi antara LAH dan residu asid amino HSA



RAJAH 7. Model dok molekul bagi interaksi LAH pada saku pengikatan protein AAG varian (A) F1*S dan (B) A. (I) Orientasi pengikatan bagi konformasi LAH yang paling stabil (berwarna kuning) pada kedua-dua varian AAG. (II) Gambaran skematik daya intermolekul yang terlibat dalam interaksi antara LAH dan residu asid amino AAG

satu dengan Ser-125 bagi varian A. Walaupun interaksi LAH–AAG varian A juga melibatkan satu ikatan hidrogen karbon (dengan Ser-114), ikatan ini adalah dikategorikan sebagai lemah berbanding ikatan hidrogen konvensional. Selain itu, sumbangan daya hidrofobik dan interaksi yang melibatkan sistem π adalah sangat signifikan dalam pengikatan LAH dengan kedua-dua varian AAG, dengan kewujudan ikatan π - π , π -alkil dan π -anion.

KESIMPULAN

Hasil kajian spektroskopi UV-Vis mengesahkan berlakunya pembentukan kompleks antara LAH dan kedua-dua protein tersebut. Ini juga disokong oleh perbezaan morfologi dan dimensi protein sebelum dan selepas penambahan LAH yang dicerap melalui mikroskopi daya atom. Analisis pengikatan menggunakan kaedah spektroskopi menunjukkan bahawa afiniti pengikatan protein–LAH adalah sederhana. Analisis struktur LAH dan hasil dok molekul mendedahkan kehadiran pelbagai daya intermolekul dalam interaksi LAH–protein termasuk ikatan hidrogen, daya hidrofobik dan pelbagai interaksi sistem- π . Seterusnya, tapak II HSA dikenal pasti sebagai tapak pengikatan primer bagi LAH, manakala tapak I merupakan tapak pengikatannya yang sekunder. Hasil kajian ini memfokuskan kepada pemahaman mengenai pengikatan LAH pada protein pengangkut manusia dan berpotensi menyumbang kepada pembangunan dadah antihipertensi berasaskan LAH yang lebih berkesan dan selamat pada masa akan datang.

PENGHARGAAN

Sampel sebatian LAH adalah pemberian daripada Adyani Azizah Abd Halim dari Universiti Malaya. Penyelidikan ini dibiayai oleh geran penyelidikan FRGS/1/2019/STG04/UKM/02/6 oleh Kementerian Pendidikan Tinggi Malaysia dan peruntukan dana penyelidikan pelajar tahun akhir daripada Universiti Kebangsaan Malaysia.

RUJUKAN

- Abdullah, A. & Yusof, M.K. 2019. Labetalol: A brief current review. *Pharmacophore* 10(6): 50-56.
- Abi-Khalil, E., Segond, D., Terpstra, T., André-Leroux, G., Kallassy, M., Lereclus, D., Bou-Abdallah, F. & Nielsen-Leroux, C. 2015. Heme interplay between IIsA and IsdC: Two structurally different surface proteins from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850(9): 1930-1941.
- Affandi, I.S.M., Lee, W.Q., Feroz, S.R., Mohamad, S.B. & Tayyab, S. 2017. Interaction of statin, a STAT3 inhibitor with human serum albumin: Spectroscopic and computational study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35(16): 3581-3590.
- 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 α -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.
- 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 bioinformatics studies. *Biophysical Chemistry* 305: 107140.
- Aryanto, D., Othaman, Z., Ismail, A.K. & Ameruddin, A.S. 2010. Surface morphology on In_{0.5}Ga_{0.5} quantum dots grown using Stranski-Krastanov growth mode. *Sains Malaysiana* 39(6): 1025-1030.
- 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* 22: 117337.
- Bakar, K.A., Lam, S.D., Sidek, H.M. & Feroz, S.R. 2020. Characterization of the interaction of diosgenin with human serum albumin and α 1-acid glycoprotein using biophysical and bioinformatic tools. *Journal of Molecular Liquids* 306: 112865.
- Bertoza, L.C., Neto, E.T., Oliveira, L.C. & Ximenes, V.F. 2018. Oxidative alteration of Trp-214 and Lys-199 in human serum albumin increases binding affinity with phenylbutazone: A combined experimental and computational investigation. *International Journal of Molecular Sciences* 19(10): 2868.
- 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.
- Chen, C.B., Hammo, B., Barry, J. & Radhakrishnan, K. 2021. Overview of albumin physiology and its role in pediatric diseases. *Current Gastroenterology Reports* 23(8): 11.
- Dos Santos, R., Figueiredo, C., Viecevski, A.C., Pina, A.S., Barbosa, A.J.M. & Roque, A.C.A. 2019. Designed affinity ligands to capture human serum albumin. *Journal of Chromatography A* 1583: 88-97.
- Ekawati, L., Nurohmah, B.A., Syahri, J. & Purwono, B. 2022. Substituted 3-styryl-2-pyrazoline derivatives as an antimalaria: synthesis, *in vitro* assay, molecular docking, druglikeness analysis and ADMET prediction. *Sains Malaysiana* 51(10): 3215-3236.
- Elhefnawy, O. & Elabd, A. 2018. Spectrophotometric determination of UO₂²⁺ by a new chemosensor labetalol hydrochloride. *Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications* 51(3): 121-129.

- Elpek, G.O. 2021. Orosomuroid in liver disease. *World Journal of Gastroenterol* 27(45): 7739-7747.
- Feroz, S.R., Mohamad, S.B., Bakri, Z.S.D., Malek, S.N.A. & Tayyab, S. 2013. Probing the interaction of a therapeutic flavonoid, pinostrobin with human serum albumin: Multiple spectroscopic and molecular modeling investigations. *PLoS ONE* 8(10): e76067.
- Gao, W., Li, N., Chen, Y., Xu, Y., Lin, Y., Yin, Y. & Hu, Z. 2010. Study of interaction between syringin and human serum albumin by multi spectroscopic method and atomic force microscopy. *Journal of Molecular Structure* 983(1-3): 133-140.
- Goncharova, I., Jašprová, J., Vitek, L. & Urbanová, M. 2015. Photo-isomerization and oxidation of bilirubin in mammals is dependent on albumin binding. *Analytical Biochemistry* 490: 34-45.
- Gotti, R., Bertucci, C., Andrisano, V., Pomponio, R. & Cavrini, V. 2003. Study of donepezil binding to serum albumin by capillary electrophoresis and circular dichroism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377(5): 875-879.
- Halgren, T.A. 1999. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *Journal of Computational Chemistry* 20(7): 720-729.
- 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.
- Lee, W.Q., Affandi, I.S.M., Feroz, S.R., Mohamad, S.B. & Tayyab, S. 2017. Evaluation of pendimethalin binding to human serum albumin: Insights from spectroscopic and molecular modeling approach. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 31(2): e21839.
- Lee, Y.S., Choi, J.W., Hwang, I., Lee, J.W., Lee, J.H., Kim, A.Y., Huh, J.Y., Koh, Y.J., Koh, G.Y., Son, H.J., Masuzaki, H., Hotta, K., Alfadda, A.A. & Kim, J.B. 2010. Adipocytokine orosomuroid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation. *The Journal of Biological Chemistry* 285(29): 22174-22185.
- Luo, Z., Lei, H., Sun, Y., Liu, X. & Su, D-F. 2015. Orosomuroid, an acute response protein with multiple modulating activities. *Journal of Physiology and Biochemistry* 71(2): 329-340.
- Mishra, V. & Heath, R.J. 2021. Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture. *International Journal of Molecular Sciences* 22(16): 8411.
- Mohamed, W.R., Mahmoud, N., Abdel Samad, F., Ahmed, E., Hamblin, M.R. & Mohamed, T. 2022. Rapid monitoring of serum albumin as a biomarker of liver and kidney diseases using femtosecond laser-induced fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 268: 120646.
- 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.
- Nozaki, A., Hori, M., Kimura, T., Ito, H. & Hatano, T. 2009. Interaction of polyphenols with proteins: Binding of (-)-epigallocatechin gallate to serum albumin, estimated by induced circular dichroism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57(2): 224-228.
- Omar, M.A., Derayea, S.M., Abdel-Lateef, M.A. & El Hamd, M.A. 2018. Derivatization of labetalol hydrochloride for its spectrofluorimetric and spectrophotometric determination in human plasma: Application to stability study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 190: 457-463.
- Otagiri, M. 2005. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 20(5): 309-323.
- Pettersen, 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.
- Ravindar, L., Ng, Y.H., Bakar, K.A., Hidayat, A.F.A., 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 potential antimalarial agents. *Sains Malaysiana* 53(8): 1953-1968.
- Ruiz, M. 2021. Into the labyrinth of the lipocalin α 1-acid glycoprotein. *Frontiers in Physiology* 12: 686251.
- Russi, M., Cavalieri, G., Marson, D., Laurini, E. & Pricl, S. 2022. Binding of the B-Raf inhibitors dabrafenib and vemurafenib to human serum albumin: A biophysical and molecular simulation study. *Molecular Pharmaceutics* 19(5): 1619-1634.
- Salem, A.E. 2017. Labetalol hypotensive anesthetic protocol paves the way to safe open abdominal myomectomy. *Journal of Anesthesia & Intensive Care Medicine* 3(2): 555606.
- Shalihin, M.S.E., Harun, Z. & Osman, I.F. 2020. Essential hypertension onset in a 12-year-old adolescent. *Sains Malaysiana* 49(1): 129-132.
- Sharaf, A., El-shazly, K.A., Abd El Latif, A., Abdelkawy, K.S., Elbarbry, F. & Khalifa, H.O. 2021. Comparative evaluation of the effects of atorvastatin and lovastatin on the pharmacokinetics of aliskiren in rats. *Sains Malaysiana* 50(3): 829-837.
- Tayyab, S. & Feroz, S.R. 2021. Serum albumin: Clinical significance of drug binding and development as drug delivery vehicle. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 123: 193-218.
- Trynda-Lemiesz, L. 2004. Paclitaxel-HSA interaction. Binding sites on HSA molecule. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12(12): 3269-3275.

- Vlasova, I.M. & Saletsky, A.M. 2009. Study of the denaturation of human serum albumin by sodium dodecyl sulfate using the intrinsic fluorescence of albumin. *Journal of Applied Spectroscopy* 76(4): 536-541.
- Webster, L.M., Webb, A.J. & Chappell, L.C. 2018. What is the evidence for using labetalol as a first-line treatment option for hypertension in pregnancy? *Drug and Therapeutics Bulletin* 56(9): 107-111.
- Zainal, M.H.B., Mark-Lee, W.F., Tahir, S.M., Ahmad, I.B. & Kassim, M.B. 2018. Experimental and DFT investigation on the influence of electron donor/acceptor on the hydrogen bonding interactions of 1-(1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(R-benzoylthiourea). *Sains Malaysiana* 47(5): 923-929.
- 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. & Iwao, Y. 2007. The drug binding site of human α 1-acid glycoprotein: Insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770(5): 797-809.
- Zsila, F., Bikadi, Z., Malik, D., Hari, P., Pechan, I., Berces, A. & Hazai, E. 2011. Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics* 27(13): 1806-1813.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: shevin@ukm.edu.my