การเปลี่ยนแปลงระดับของไพริเมธามีน

ในหนูติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี ชนิดต้านและไม่ต้านไพริเมธามีน

เมื่อศึกษาโดยวิธีคอมเพทิทีฟไบน์ดิง

โดย

นางสาวธนาภรณ์ ตันเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2529

ISBN-974-566-673-4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

011767

I 15820683.

TURNOVER OF PYRIMETHAMINE IN MICE INFECTED WITH SENSITIVE AND RESISTANT *PLASMODIUM CHABAUDI* MEASURED BY COMPETITIVE BINDING ASSAY

Miss Thanaphorn Tanchareon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1986

ISBN 974-566-673-4

Thesis Title	Turnover of Pyrimethamine in Mice Infected with Sensitive and Resistant *Plasmodium chabaudi* Measured by Competitive Binding Assay.
By	Miss Thanaphorn Tanchareon
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....S. Bhisalbutra.....

(Associate Professor Sorachai Bhisalbutra, Ph.D.)

Acting Associate Dean for Academic Affairs

for

Acting Dean of the Graduate School

Thesis Committee

Jariya Boonjawat ..... Chairman

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Sanha Panichajakul ..... Member

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

Nikom Chaisiri ..... Member

(Associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D.)

Preeda Chaisiri ..... Member

(Preeda Chaisiri, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงระดับของไพริเมธามีนในหนูติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี ชนิดต้านและไม่ต้านไพริเมธามีน เมื่อศึกษาโดยวิธีคอมเพททิทีฟไบน์ดิง
ชื่อนิสิต	นางสาวธนาภรณ์ ตันเจริญ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2528

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วิธีคอมเพททิทีฟไบน์ดิงได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้วัดหาปริมาณของไพริเมธามีน โดยอาศัยคุณสมบัติในการแย่งที่ของการจับระหว่าง ^{14}C-pyrimethamine/ไพริเมธามีนกับ ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส (Tetrahydrofolate dehydrogenase ; 5,6,7,8-tetrahydrofolate : $NADP^+$ oxidoreductase ; EC 1.5.1.3) ซึ่งสกัดจากตับหนู สภาวะเหมาะสมของการวัดปริมาณประกอบด้วย โปตัสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5, 0.1 นาโนโมลาร์ NADPH, 10 นาโนโมลาร์ ^{14}C-pyrimethamine และไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส 23.7 หน่วย ในสารละลายปฏิกริยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วแยกไพริเมธามีนอิสระที่เหลือจากการรวมตัวกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสด้วย 25 ไมโครลิตร ของ 10% dextran-coated charcoal วิธีซึ่งพัฒนาขึ้นทำได้รวดเร็ว มีความไวของวิธีวัด 5 นาโนกรัม/มิลลิลิตรพลาสมา และ 90 นาโนกรัม/กรัมตับ และความจำเพาะสูง สามารถวัดปริมาณไพริเมธามีนในช่วง 20-300 นาโนโมลาร์ อีกทั้งยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวัดปริมาณไพริเมธามีนในพลาสมาของคน (โปรตีน 39 มิลลิกรัม) และพลาสมาของหนูไมซ์ (โปรตีน 35 มิลลิกรัม) ได้โดยไม่มีผลกระทบจากอนุพันธ์ของโฟเลตชนิดอื่น เช่น 5-methyltetrahydrofolate และกรดโฟลิค ฯลฯ

เมื่อนำวิธีคอมเพทิทีฟไบน์ดิงที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้วัดระดับของไพริเมธามีน ในพลาสมาตับ และเม็ดเลือดแดง ของหนูติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี หลังจากหนูได้รับไพริเมธามีนแบบ single dose เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของไพริ-เมธามีนต่อเชื้อมาลาเรีย จากผลการทดลองสามารถให้ข้อเสนอแนะได้ว่าปริมาณของไพริเมธามีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่หนูได้รับแบบ single dose ไม่ว่าจะโดยวิธีกินหรือฉีดเข้าทางช่องท้อง สามารถออกฤทธิ์ในการบำบัดรักษาหนูไมซ์ที่ติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี ทั้งโคลน AS และ AS (Pr_1) ซึ่งมีเปอร์เซนต์การติดเชื้อสูงถึง 20-40% ได้ สันนิษฐานว่ากลไกที่สำคัญของไพริเม-ธามีนในการบำบัดรักษาก็คือ สามารถคงระดับของเซลเม็ดเลือดแดงติดเชื้อในระบบหมุนเวียนโลหิต ให้อยู่ต่ำกว่าระดับที่จะเป็นอันตรายต่อชีวิตหนูช่วงระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นภูมิคุ้มกันซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยการเหนี่ยวนำของพลาสโมเดียม จึงเริ่มมีบทบาทโดยตรงต่อการกำจัดเชื้อมาลาเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Turnover of Pyrimethamine in Mice Infected with Sensitive and Resistant *Plasmodium chabaudi* Measured by Competitive Binding Assay.

Name Miss Thanaphorn Tanchareon

Thesis Advisor Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Department Biochemistry

Acadmic Year 1985

ABSTRACT

The competitive binding assay has been developed for pyrimethamine based on the competitive binding between ^{14}C-pyrimethamine/pyrimethamine and purified rat liver dihydrofolate reductase (tetrahydrofolate dehydrogenase; 5,6,7,8-tetrahydrofolate : $NADP^+$ oxidoreductase; EC 1.5.1.3). The assay was performed at the optimal conditions; pH 6.5, using potassium phosphate buffer, with the presence of 0.1 mM NADPH, 10 nM ^{14}C-pyrimethamine and 23.7 units of purified rat liver dihydrofolate reductase in an assay volume of 1 ml. The assay mixture was incubated for 15 minutes at 4^{o}C. Free pyrimethamine was separated from that bound to reductase by adsorption with 25 ul of 10% dextran-coated charcoal slurry. The method developed is rapid, highly specific and has the sensitivity of 5 ng/ml plasma and 90 ng/g liver. The amount of pyrimethamine could be detected in the range of 20-300 nM. This method can be applied to determine the amount of pyrimethamine in intact human

plasma (39 mg proteins), human serum (49 mg proteins) and mouse plasma (35 mg proteins) without being interfered by incubating folates such as 5-methyl-tetrahydrofolate and folic acid, etc. which are present in the body fluids.

In order to study the mechanism of pyrimethamine therapeutic action on parasites, the competitive binding assay method was used to determine pyrimethamine level in plasma, liver and red blood cells of *P. chabaudi* infected mice after treated with single dose of pyrimethamine. From the results studied, they suggested that the effective dose of pyrimethamine for the therapeutic action in mice infected with *P. chabaudi* clone AS and AS(Pr_1) as high as 20-40% parasitemia was 5 mg/kg body wt with single treatment both oral and intraperitoneal administration. The mechanism of pyrimethamine therapeutic action in mice infected with *P. chabaudi* might be due to the retainment of parasitemia at the level of sub-lethal dose for a certain period of time and then the function of immune response to the infection of infected plasmodium itself was involved directly to the clearance of parasites from the whole system.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my most sincere gratitute and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Sanha Panichajakul for his earnest and valuable advices, guidances, criticisms and encouragement throughout the course of the research studies.

Special appreciation is also respectfully submitted to all members of the advisory committee for their kind and helpful comments and assistance in reviewing the results of findings in the final research report.

I am particularly grateful to all fellows and colleagues and everyone in the Department of Biochemistry, Faculty of Science who had courteously assisted and provided not only facilities but also materials and constructive criticisms and positive and benefitial advices.

Infinite gratefulness is respectfully submitted to my parents who have been so kindly supported and encouraged all my strives for progress with aim to be able to contribute to the advances in science and in the society.

Lastly, I must faithfully submit my indebtedness to the Graduate School, Chulalongkorn University for the funding of this research studies and sincerely wish that the report would be of some benefits to those who would persue further studies in more depth in the same subject matter.

CONTENTS

		Page
THAI ABSTRACT	.....	iv
ENGLISH ABSTRACT	.....	vi
ACKNOWLEDGEMENT	.....	viii
CONTENTS	.....	ix
LIST OF TABLES	.....	xi
LIST OF FIGURES	.....	xii
ABBREVIATIONS	.....	xv

CHAPTER

I	INTRODUCTION	1
II	MATERIALS, CHEMICALS AND EQUIPMENTS ..	15
III	METHODS	19
IV	RESULTS	
	1. Purification of dihydrofolate reductase from rat liver	32
	2. Properties of DHFR from rat liver .	32
	3. Optimization of the competitive binding assay for pyrimethamine ...	38
	4. Kinetic of binding between pyrimethamine and rat liver DHFR	46
	5. Standardization of competitive binding assay for pyrimethamine ...	46
	6. Optimal amount of 95% ethanol used for the extraction of pyrimethamine from liver and red blood cells	56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

7. Determination of pyrimethamine levels in plasma of *Plasmodium chabaudi* infected mice by competitive binding assay method 58

V DISCUSSION 76

REFERENCES 94

APPENDIX 102

BIOGRAPHY 106

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Purification of DHFR from rat liver	33
2	Precision of competitive binding assay for pyrimethamine in various background of samples	53
3	Accuracy of competitive binding assay for pyrimethamine in various background of samples	54
4	Inhibition of ^{14}C-pyrimethamine binding by various kinds of folates and derivatives ...	55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The life cycle of a mammalian *Plasmodium* .	3
2	Metabolism of folate coenzyme in plasmodium and host	6
3	The effect of pH on the activity of DHFR from rat liver	35
4	Effect of pH on the interaction of pyrimethamine to rat liver DHFR	36
5	Effect of ehtanol on the activity of DHFR from rat liver	37
6	Adsorption of pyrimethamine by charcoal ..	39
7	Effect of incubation time on binding of ^{14}C-pyrimethamine to rat liver DHFR	40
8	Effect of rat liver DHFR concentration on ^{14}C-pyrimethamine binding	42
9	Effect of ^{14}C-pyrimethamine concentration on binding to rat liver DHFR	43
10	Effect of NADPH concentration on ^{14}C-pyrimethamine binding to rat liver DHFR	44
11	Effect of pH on binding of ^{14}C-pyrimethamine to rat liver DHFR	45
12	A Scatchard plot of ^{14}C-pyrimethamine binding to rat liver DHFR	47
13	Standard curve of pyrimethamine determination	49

Figure		Page
14a	Optimal amount of 95% ethanol used for the extraction of pyrimethamine from liver homogenate	57
14b	Optimal amount of 95% ethanol used for the extraction of pyrimethamine from red blood cells	57
15	Parasitemia in mice infected with *P. chabaudi*	60
16	Parasitemia in mice infected with *P. chabaudi* and treated with single dose of pyrimethamine orally (5 mg/kg body wt)	61
17	Levels of pyrimethamine in plasma of mice after treated with single dose of pyrimethamine orally (5 mg/kg body wt)	64
18	Levels of pyrimethamine in liver of mice after treated with single dose of pyrimethamine orally (5 mg/kg body wt)	65
19	Levels of pyrimethamine in red blood cells of mice after treated with single dose of pyrimethamine orally (5 mg/kg body wt) ...	66
20	Parasitemia in mice infected with *P. chabaudi* and treated with single dose of pyrimethamine intraperitoneally (5 mg/kg body wt)	69
21	Levels of pyrimethamine in plasma of mice after treated with single dose of pyrimethamine intraperitoneally (5 mg/kg body wt)	70

Figure Page

22 Parasitemia in mice infected with *P. chabaudi* and treated with single dose of pyrimethamine intraperitoneally (30 mg/kg body wt) 74

23 Levels of pyrimethamine in plasma of mice after treated with single dose of pyrimethamine intraperitoneally (30 mg/kg body wt) 75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

ACD	Acid citrate dextrose
cm	Centimeter
C.V.	Coefficient of variation
^{o}C	Degree celcius
DHF, FH_2	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate reductase
g	Gram or Gravitational acceleration
GTP	Guanosine triphosphate
hr	Hour
kg	Kilogram (10^{3} gram)
KCl	Potassium chlororide
mg	Milligram (10^{-3} gram)
ml	Millilitre (10^{-3} litre)
min	Minute
mM	Millimolar (10^{-3} molar)
M	Molar
ng	Nanogram (10^{-9} gram)
nM	Nanomolar (10^{-9} molar)
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
OD	Optical density
PABA	para-Aminobenzoic acid
rbc	Red blood cell
sec	Second
THF, FH_4	Tetrahydrofolate
ul	Microlitre (10^{-6} litre)
umole	Micromole (10^{-6} molar)
vol	Volume
wt	Weight

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย