บทที่ 2

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ Adenosine deaminase (ADA)

ในส่วนนี้จะเขียนเฉพาะพื้นฐานของ Adenosine deaminase ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยดังนี้

1 . Adenosine Deaminase and Purine Metabolism

1.1 Purine Metabolism

1.2 Adenosine deaminase

2. ADA and Mononuclear cell

2.1 Adenosine and lymphocyte

2.2 Adenosine and monocyte

3. วิธีการวิเคราะห์หาค่า ADA activity

1. Adenosine Deaminase and Purine Metabolis

ADA เป็น enzyme ที่สำคัญในการเปลี่ยน Adenosine เป็น Inosine ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ Purine metabolism ระยะ 20 ปีที่ผ่านมาเริ่มมีผู้ให้ความสนใจกันมากขึ้น หลังจากพบว่าการขาด ADA เป็นสาเหตุที่สำคัญของ Severe combined immune deficiency disease (Eloise,1972) และ ADA มีความเกี่ยวข้องกับ cell mediated immune response ในระยะหลังเริ่มนำมาใช้ประโยชน์ทางคลีนิคกันมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งนำมาช่วยในการวินิจฉัยแยกโรควัณโรคของ เยื่อหุ้มสมอง (Petersson, 1991) เยื่อหุ้มหัวใจ (Martinez, 1986) เยื่อบุช่องปอด (Piras et al.,1978 ; Ocana et al., 1983 ; Niwa et al., 1985 ; Bueso et al., 1988 ; Baganha et al.,1990 ; Banales et al., 1991; Valdes et al., 1993) และช่องท้อง(Bastani, 1985 ; Martinaze,1986 ; Voigt, 1989 ; Dawivedi,1990 ; Rodriguez, 1991 ; Gupta, 1992 ; Soliman,1994) จากสาเหตุอื่นๆ

1.1 **Purine Metabolism** (Sodeman,1985 ; Smith,1985)

Purine base ในคนมี 2 ชนิดคือ Adenine และ Guanine เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ

ก. Necleotide ซึ่งนำไปสร้าง DNA และ RNA

ข. Moleculeที่ให้พลังงานและมีความสำคัญในปฏิกิริยาต่างๆของร่างกาย เช่น ATP , GTP , UTP , NAD , cAMP , cGMP เป็นต้น

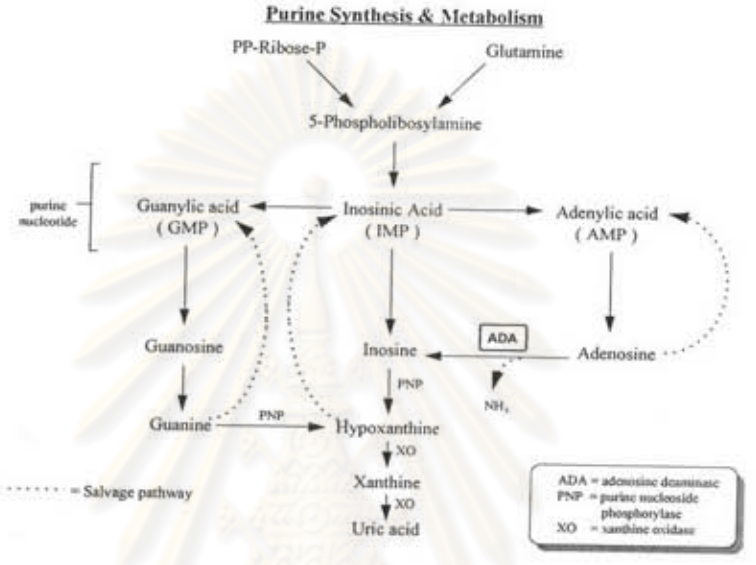
Purine base สังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายได้ 2 วิธีคือ

I. De novo synthesis จาก PP-Ribose-P และ Glutamine ดังที่แสดงในภาพที่ 1

II. Salvage synthesis เป็นการนำ metabolites ต่างๆ ของ purine กลับมาใช้ใหม่ดังภาพ

ผลของ metabolism สุดท้ายเกิดเป็น uric acid ขับออกทางไต จะเห็นว่า ADA นั้นเป็น enzyme deamination เปลี่ยน adenosine เป็น inosine ผลของปฏิกิริยาจะเกิด NH_3 ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์หา activity ของ ADA โดยวิธีการต่างๆต่อไป (Ellis,1970,1973 ; Giusti,1974)

ภาพที่ 1 Purine synthesis and metabolism



1.2 Adenosine deaminase

พบได้ในทุกส่วนของร่างกายพบมากในอวัยวะหรือบริเวณที่มี Lymphoid tissue เช่น ตับ ม้าม นอกจากนี้ยังพบได้ในเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะ Monocyte และ Lymphocyte (Hovi, 1976 ; Carson, 1976 ; Fischer, 1976)

ADA แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามขนาดโมเลกุล คือ ADA1 (MW 280 , 35 kDa) และ ADA2 (MW 100 kDa) โดยทั้งสองชนิดจะมี activity สูงขึ้นในภาวะที่แตกต่างกันเช่น ADA2 activity เพิ่มขึ้นใน Chronic liver disease cirrhosis ส่วน ADA1 activity เพิ่มขึ้นในภาวะ Acute hepatitis เป็นต้น (Kobayashi, 1993 ; Muraoka, 1990)

2. ADA and Mononuclear cell

2.1 ADA and lymphocyte (Hovi, 1976 ; Carson,1976)

Hall et al. 1963 กระตุ้น lymphocyte ของแกะโดย เม็ดเลือดแดงของไก่ พบว่าระดับของ ADA activity ใน lymphocyte สูงขึ้น ในผู้ป่วยที่มี ADA deficiency จะมี CMI และ HMI defect มี

ทดลองถ่ายเอกสาร สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

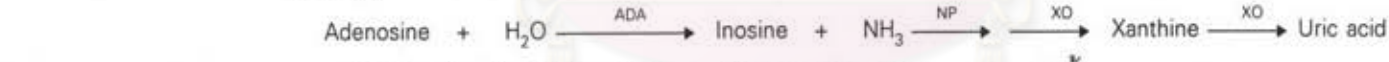
lymphopenia ไม่สามารถกระตุ้นโดย mitogen ได้ พบว่าถ้ากระตุ้น Lymphocyteโดย Phytohemagglutinin ระดับของ ADA activity จะสูงขึ้นก่อนการสร้าง DNA ถ้ายับยั้ง ADA โดย ADA inhibitor (Cofomycin หรือ ENHA) จะมีผลยับยั้งการสร้าง DNA ของ Lymphocyte ADA มีความสำคัญต่อ maturation ของ lymphocyte ถือได้ว่าเป็นตัวบ่งชี้ของ cellular immune response ของร่างกาย ค่าปกติของ ADA activity ใน lymphocyte ประมาณ 3.2 +/-1.0 U / 10^6 wbc พบว่า T cell มีค่าสูงกว่า B cell ระดับ ADA activity ใน blast ของ ALL และ CLLระยะ blast transformationโดยเฉพาะกลุ่ม ที่มาจาก T cell line จะมีค่าสูง เช่นกัน

2.2 ADA and Monocyte (Fischer, 1976)

moncyte พบใน peripheral blood ประมาณ 3-7% มี half life ประมาณ 8 ช.ม. ถ้ามีการอักเสบเกิดขึ้น monocyte จะเคลื่อนผ่านผนังเส้นเลือดเข้าสู่บริเวณที่อักเสบกลายเป็น macrophage ทำหน้าที่ phagocte และ ทำลาย antigen ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็น macrophage นั้น พบว่าระดับของ ADA activity เพิ่มขึ้นถึง 9 เท่าในวันแรกในขณะที่ enzyme อื่นๆใน Salvage pathway ของ purine metabolism ไม่เปลี่ยนแปลง ถ้ายับยั้ง ADA โดย ENHA จะมีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงจาก monocyte เป็น macrophage แสดงว่า ADA นั้นมีบทบาทใน maturation ของ monocyte จึงมีความสำคัญทั้งใน CMI และ HMI

3. วิธีการวิเคราะห์หาค่า ADA activity

ADA catalized การเปลี่ยนแปลง จาก Adenosine เป็น inosine ทำให้เกิด NH_3 และสุดท้ายของปฏิกิริยาได้เป็น uric acid ดังภาพ



จากปฏิกิริยาข้างต้นใช้เป็นหลักในการวิเคราะห์หา ADA activity ดังนี้

1) วัด Absorbance ที่ 256 nm โดย spectrophotometry . จะลดลงเมื่อ Adenosine เปลี่ยนเป็น inosine
2) Inosine เปลี่ยนเป็น Uric acid โดย neucleoside phosphorelase จะเพิ่ม absorbance ที่ 293 nm.
3) วัด Adenosine concentration โดย Polarlographic method
4) วัด Ammonia ที่เกิดขึ้น โดยวิธีทาง Chemistry หรือ Enzymatic method (kinetic method)

วิธีแรกมีปัญหาในการวิเคราะห์เมื่อมี concentration หรือ turbidity ของ substrate สูง วิธีที่สองต้องการระดับของ endogenous nucleoside phosphorelase ที่สูง ส่วนวิธีที่สามเป็นที่ยอมรับกันน้อย วิธีที่สี่ เป็นที่นิยมกันทั่วไปโดยมีหลักการและวิธีการดังนี้

4.1) วิธีทาง Chemistry โดยใช้ Colorimetric method โดยวิธีของ Giusti (Giusti, 1974)ซึ่งทำได้ง่าย ราคาถูก ใน Reference ต่างๆ รวมทั้งการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทย(สมพงษ์ องอาจ

ยุทธ 2527 ; รังสรรค์ ปุษปาคม 2531, 2533 ; Somchai Bovornkitti,1988 ; Runsun Puspakom1990) ส่วนมากใช้วิธีนี้ แต่มีข้อเสียบางประการคือ การรบกวนการวิเคราะห์โดย substrate protein และไม่สามารถปรับเปลี่ยนเป็นวิธี Automatic ได้

4.2) Kinetic method (Ellis, 1970 , 1973)โดยใช้หลักการ Couple reaction ทำปฏิกิริยากับ NH_3 ที่เกิดขึ้นมีผลทำให้ลด absorbance ที่ 340 nm. ดังภาพ

$$\text{Adenosine} + H_2O \xrightarrow{\text{ADA}} \text{Inosine} + NH_3$$

$$NADH + NH_3 + 2\ \text{oxoglutarate} \xrightarrow{\text{GDH}} NAD^+ + \text{L-glutamate}$$

เป็นวิธีการที่กำลังได้รับความนิยม สามารถใช้วัดหาระดับ enzyme ชนิดอื่นที่มี NH_3 เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา วิธีการนี้ไม่ถูกรบกวนจาก High substrate concentration สามารถวัดระดับ enzyme ได้ใน material ที่มี Activity ต่ำ และสามารถปรับเปลี่ยนเป็นวิธีอัตโนมัติได้ วิธีวิเคราะห์นั้นจะเขียนไว้ในส่วนของวิธีการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย