

ایزوآنزیم‌های سرمی آدنوزین د - آمیناز (ADA) - آمیناز در بیماران مسلول و افراد شاهد

حیدر طویلانی^۱ - دکتر محمود جلالی^۲
چکیده

مقدمه: آنزیم آدنوزین د - آمیناز (ADA) یکی از آنزیم‌های هیدرولاز است که باعث تبدیل آدنوزین به اینوزین و آمونیاک می‌شود. فعالیت این آنزیم به طور گسترده‌ای در همه بافت‌های پستانداران وجود دارد. در سرم انسان سه ایزو آنزیم ADA وجود دارد. ADA1 با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون، ADA1+CP متشکل از ترکیب دو ملکول ADA1 با پروتئین دیگر با وزن مولکولی ۲۸۰ کیلو دالتون و ADA2 با وزن ملکولی ۱۰۰ کیلو دالتون.

مواد و روش: ۲۰ فرد شاهد در محدوده سنی ۴۰-۲۰ سال و ۱۰ بیمار مسلول در محدوده سنی ۶۰-۳۵ سال انتخاب و فعالیت ایزوآنزیم‌های آنان به روش‌های ژل فیلتراسیون و کلریمتری اندازه‌گیری شد.

نتایج: میانگین فعالیت ایزوآنزیم ADA1+CP در سرم افراد شاهد و بیماران مسلول (۶/۹۰۱/۷۸۴/۰۰/۷۹) ADA2، (۱۲/۸۹۱/۸۰) و (۲۲/۵۰۴/۶۵) ADA1 و (۱/۷۰۰/۳۳ و ۱/۵۶۰/۳۷) واحد بر لیتر می‌باشد. میانگین فعالیت ایزوآنزیم‌های ADA1+CP، ADA2 در افراد شاهد و بیماران مسلول اختلاف معنی داری را نشان داد.

بحث: به دلیل وجود ایزوآنزیم ADA2 در منوسیت‌ها، به احتمال ایزوآنزیم ADA2 سرمی از این سلول‌ها منشأ می‌گیرد.

کل واژگان: آدنوزین د - آمیناز، ایزوآنزیم، منوسیت، بیماران مسلول

مجله پزشکی ارومیه، سال دوازدهم، شماره یک، ص ۳۷-۳۲، بهار ۱۳۸۰

۱- مربی گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی همدان

۲- دانشیار گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشکده علوم پزشکی تهران

مقدمه

آنزیم آدنوزین د - آمیناز (ADA) یکی از آنزیم‌های هیدرولاز است که با استفاده از یک ملکول آب باعث حذف آمونیاک از آدنوزین و دزوکسی آدنوزین شده و آنها را به ترتیب به اینوزین و دزوکسی اینوزین تبدیل می‌کند (۱). در انسان این آنزیم به طور گسترده‌ای در بافت‌های مختلف وجود دارد و در متابولیسم نوکلئوتیدهای پورینی نقش مهمی را ایفا می‌کند. کمبود ADA باعث ایجاد نقص ایمنی شدید و مرکب SCID می‌شود (Sever combined immunodeficiency disease) (۲) که در طی آن، لنفوسیت‌های B و T تکامل نیافته و عمل طبیعی خود را انجام نمی‌دهند. (۳)

ژن ADA انسان روی بازوی دراز کروموزوم ۲۰ قرار دارد و طول تقریبی آن ۳۲kb می‌باشد. (۴)

در سرم انسان، سه ایزوآنزیم ADA وجود دارد (۵) ایزوآنزیم ADA1 با وزن مولکولی ۳۵ دالتون و در ترکیب غیر آنزیمی، دو مولکول ADA1 با پروتئین دیگری به نام combining protein ایجاد ایزوآنزیم ADA1+CP به وزن مولکولی ۲۸۰ دالتون را می‌دهد. ایزوآنزیم ADA2 نیز به وزن مولکولی ۱۰۰ دالتون در سرم انسان وجود دارد. ایزوآنزیم ADA2 نه تنها در خواص کیتینکی، بلکه در خواص ایمونوشیمیایی نیز با ایزوآنزیم‌های ADA1+CP, ADA2 تفاوت دارد. (۶)

جهت اندازه‌گیری ایزوآنزیم‌های ADA، روش‌های مختلفی شامل: کروماتوگرافی تعویض یونی (۶)، ژل فیلتراسیون (۷)، الکتروفورز (۸)، استفاده از ماده مهارکننده erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) که باعث

مهار ایزوآنزیم‌های ADA1+CO, ADA1 شده ولی مهارکننده ایزوآنزیم‌ها ADA2 نمی‌باشد (۹) و همچنین از تفاوت ایزوآنزیم‌های ADA2, ADA1 در واکنش با آدنوزین و دزوکسی آدنوزین استفاده می‌شود (۱۰)

افزایش فعالیت ADA در مایع پلور بیماران مسلول گزارش شده است (۹). همچنین افزایش فعالیت ایزوآنزیم‌های ADA1+CP, ADA1 در سرم بیماران هپاتیت، منونوکلئوز عفونی، پنومونی، روماتوئید آرتریت و سل مشاهده شده است (۸).

مواد و روش

جهت بررسی فعالیت ایزوآنزیم‌های ADA، ۲۰ فرد شاهد (۸ زن و ۱۲ مرد) در محدوده سنی ۲۰-۴۰ سال و ۱۰ بیمار مسلول (مرد) در محدوده سنی ۳۵-۶۰ سال انتخاب و فعالیت ایزوآنزیم‌ها در آنها اندازه‌گیری شد. از روش ژل فیلتراسیون (۷) جهت اندازه‌گیری ایزوآنزیم‌های ADA استفاده شده است. در این روش، سرم را پس از رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۴۵ درصد اشباع و با حل کردن رسوب در بافر فسفات با pH=۶/۵ و غلظت ۰/۱ مولار در حجم ۲ میلی لیتر به ستونی به طول ۷۰ و قطر ۱/۶ سانتی متر که با ژل سفاکریل S-300HR پر شده و از قبل با مارک‌های با وزن مولکولی مابین دو میلیون تا ۱۳۵۵ دالتون استاندارد شده است، تزریق نمایند. سرعت جریان ۲۰ ml/hr و حجم فراکسیون‌ها ۲ میلی متر جمع آوری می‌شود. پس از جمع آوری فراکسیون‌ها، فعالیت هر ایزوآنزیم با استفاده از روش رنگ سنجی اندازه‌گیری می‌شود (۱۱).

در این روش آدنوزین تحت تاثیر ایزوآنزیم‌ها به آمونیاک و

می باشد.

کمترین فعالیت مربوط به ایزوآنزیم ADA1 بین ۲-۱/۵، ADA1+CP بین ۸-۴ و ADA2 بین ۳۲-۱۸/۵ واحد بر لیتر می باشد. نمودار ۲ میانگین فعالیت هر سه ایزوآنزیم در بیماران مسلول را با یکدیگر مقایسه می نماید.

میانگین فعالیت ایزوآنزیم ADA1+CP در گروه شاهد و بیماران مسلول با استفاده از (Students T Test) تست T، ($P < 0.001$) معنی دار می باشد.

میانگین فعالیت ایزوآنزیم ADA1 در گروه شاهد و بیماران مسلول با استفاده از تست T اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد. همچنین فعالیت ایزوآنزیم ADA2 در گروه شاهد و بیماران مسلول با استفاده از تست ($P < 0.0001$) اختلاف معنی داری را نشان می دهد. جدول (۱) میانگین فعالیت ایزوآنزیمهای افراد شاهد و بیماران مسلول را نشان می دهد.

بحث

فعالیت هر سه ایزوآنزیم با روش ژل فیلتراسیون با نتایج حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی که توسط Muraoka انجام شده (۶)، قابل مقایسه می باشد.

تعیین فعالیت ایزوآنزیمهای ADA در بافتها و سلولهای مختلف انجام گرفته است. در بافت کبد، ریه، طحال، عضله، پانکراس، لنفوسیتها و نوتروفیلها، فعالیت ADA مربوط به ایزوآنزیمهای ADA1+CP, ADA1 می باشد و ایزوآنزیم ADA2 فعالیت را نشان نمی دهد. (۸)

در بافت کلیه، فعالیت ADA، ناشی از ایزوآنزیم ADA1+CP و در اریتروسیتها ناشی از ایزوآنزیم ADA1 می باشد. (۸)

اینوزین تبدیل شده و سپس امونیاک حاصل با استفاده از روش برتوله اندازه گیری می شود. فعالیت هر ایزوآنزیم ارتباط مستقیمی با مقدار تولید امونیاک دارد.

نتایج

ایزوآنزیم ADA1+CP با وزن ملکولی ۲۸۰ دالتون، اولین ایزوآنزیم خارج شده از ستون بوده که در فراکسیونهای ۴۱ تا ۴۴ خارج می گردد. سپس ایزوآنزیم ADA2 با وزن مولکولی ۱۰۰ کیلو دالتون در فراکسیونهای ۴۸ تا ۵۳ خارج شده و ایزوآنزیم ADA1 با وزن ۳۵ کیلو دالتون در فراکسیونهای ۵۹ تا ۶۱ خارج شده است.

الف. افراد شاهد: میانگین فعالیت (meanSD) ایزوآنزیم ADA1+CP ۴/۰۰۰/۷۹، ADA1 ۱/۵۶۰/۳۷ و ADA2 ۱۲/۸۹۱/۸۰ واحد بر لیتر می باشد.

همچنین در صد فعالیت ایزوآنزیمهای ADA1+CP ۲۱/۸۳/۶، ADA1 ۸/۱۲/۳ و ADA2 ۷۰۳/۷ درصد می باشد.

کمترین فعالیت مربوط به ایزوآنزیم ADA1 و بیشترین فعالیت مربوط به ADA2 می باشد. محدوده فعالیت ADA1 بین ۱-۲، ADA1+CP بین ۳-۵/۴ و ADA2 بین ۸-۱۵ واحد بر لیتر بوده است. همچنین مجموع در صد فعالیت ایزوآنزیمهای ADA1+CP, ADA1 بین ۲۳/۶ تا ۳۶/۲ می باشد.

نمودار ۱ میانگین فعالیت هر سه ایزوآنزیم را با یکدیگر مقایسه می نماید.

ب. بیماران مسلول: میانگین فعالیت (meanSD) ایزوآنزیم ADA1+CP ADA1 ADA2 می باشد.

همچنین در صد فعالیت ایزوآنزیم ADA1+CP ADA1 ADA2

می باشد. (۸)(۹)

روش ژل فیلتراسیون می تواند در بررسی فعالیت ایزوآنزیم های ADA در مراکز تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفته و با توجه به اهمیت فعالیت ایزوآنزیم های ADA در سرم و مایع پلور در بیماریهای مختلف، می توان در تشخیص این بیماری ها به پزشک یاری رساند.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق که فعالیت ADA2 سرمی را حدود ۷۰ درصد تعیین کرده است و همچنین فعالیت ADA2 فقط در منوسیت ها مشخص شده است، احتمالاً فعالیت ADA2 سرمی از سلول های رده منوسیتی ناشی شده است و علت تفاوت درصد فعالیت های ADA2 در سرم (۷۰ درصد) و منوسیت ها (۱۸ درصد) ناشی از ترشح فعال ADA2 توسط منوسیت ها یا تفاوت طول عمر ADA2 در سرم و منوسیت ها

Refrence:

- 1- Padia RH, Geiger JD, Nagy JI: Adenosine deaminase regulation of purine actions. In: Phillis JW Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cellular function. Florida, CRC Press, 1991: 74, 87.
- 2- Restu R, Thompson L : the role of adenosine deaminase deficiency . Immunol Today, 1997, 18(8): 371-374.
- 3- Franco R : Cell surface adenosine deaminase. Prog Neurobiol, 1997, 52: 286-294.
- 4- Dan A: Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase. Biochem, 1986, 25(25): 8234-8244.
- 5- Wcyden MB, Kelley W: Human adenosine deaminase: distribution and properties. J Biol Chem, 1976, 251: 5448-5459.
- 6- Muraoka T, K atsuramaki T, Shiraishi H: Automated enzymatic measurement of adenosine deaminase isoenzyme activities in serum. Anal Blochem, 1990, 187: 268-272.
- 7- Ratech H, Hirschhorn R: Serum adenosine deaminase in normals and in a patient with adenosine deaminase deficient sever combined immuno- deficiency. Clin Chem Acta, 1981, 115: 341-347.
- 8- Ungerer J , Bissbort S, Vermaak H: Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application . Clin Chem, 1992, 38(7): 1322-1329.
- 9- Jacobus P, Ungerer M , Heila M , Johannes H: Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. Chest, 1994, 106(1): 33, 37.
- 10- Valdes L, San Jose E , Alvarez D: Adenosine deaminase isoenzyme analysis in pleural effusions. Eur Respir J, 1996, 9: 747-751.
- 11- Giusti G : Adenosine deaminase. Bergmeyer Hu, ed: Methods of enzymatic analysis. 3rd ed, Philadelphia, Faber, 1984: 315-323.

SERUM ADENOSINE DEAMINASE ISOENZYMES IN NORMALS AND TUBERCULOSIS PATIENTS

H Tavilaei¹, M.S.; M Jalali², Ph.D.

Abstract:

Introduction: Adenosine deaminase (ADA), a hydrolase, converting adenosine to inosine and ammonia, can be found extensively in all mammalian tissue. In human, adenosine - deaminating activity is exhibited by their enzymes of differing molecular weights, a monomeric 35KD catalytic units combined with a non enzymatic 200KDa protein (ADA1+CP) and a 100KDa enzyme (ADA2).

Method & Material: 20 cases as a control group with ages of 20-40 years old and 10 patients with tuberculosis ages of 35-60 years old were selected and their isoenzymes were measured by gel filtration and colorimetry methods.

Results: The mean activity of the isozyme ADA1+CP in controls and tuberculosis patients (4.000.79 and 6.901.78), ADA2 (12,891.80 AND 22.504.65) and ADA1 (1.560.37 and 1.700.33) U/L. The mean activity of ADA2 and ADA1+CP in controls and tuberculosis patients showed

1. Instructor of Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences

2. Associate Professor of Biochemistry, Tehran University of Medical Sciences

significant differences.

Discussion: *Because ADA2 could be demonstrated only in monocytes, one might assume that the serum ADA2 originates from this cell type.*

Key words : *Adenosine deaminase(ADA), isozyme, Monocyte, Tuberculosis Patients.*

Address: *Department of Biochemistry, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

Source: *UMJ 2001; 12(1) 32-37 . ISSN: 1027-3727*