ผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อการนำเข้าของไพริเมธามีน และเอนไซม์บางตัวในโฟเลตเมตาบอลิสมของพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี

นางสาว สุพร นุชดำรงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-227-4

008830

I 19000400X

EFFECTS OF PYRIMETHAMINE RESISTANCE ON THE UPTAKE OF PYRIMETHAMINE AND SOME FOLATE METABOLIZING ENZYMES IN PLASMODIUM CHABAUDI

Miss Suporn Nuchadomrong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1985

ISBN 974-564-227-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อการนำเข้าของไพริเมธามีน และเอนไซม์บางตัวในโฟเลตเมตาบอลิสมของ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี
โดย	นางสาว สุพร นุชดำรงค์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดี บัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา ลิรินตกานต์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ
(ดร.ปรีดา ชัยศิริ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อการนำเข้าของไพริเมธามีนและเอนไซม์บางตัวในโฟเลตเมตาบอลิสมของ *พลาสโมเดียม ฆาบอดี*
ชื่อนิสิต	นางสาว สุพร นุชดำรงค์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2527

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษากลไกการต้านไพริเมธามีนใน *พลาสโมเดียม ฆาบอดี* โดยอาศัยเชื้อ 2 โคลนเป็นแม่แบบ คือ โคลน AS จัดเป็นเชื้อไม่ต้านยา (ไวต่อไพริเมธามีน 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) และโคลน AS(Pr_1) จัดเป็นเชื้อต้านยา (ไวต่อไพริเมธามีน 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) เมื่อเปรียบเทียบขบวนการนำไพริเมธามีนเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ปกติ เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ *พลาสโมเดียม ฆาบอดี* ที่ต้านและไม่ต้านไพริเมธามีนโดยใช้สารกัมมันตรังสี ^{14}C-pyrimethamine ย้อมูลเบื้องต้นบ่งชี้ว่า การนำเข้าของไพริเมธามีนจะช้าสุดในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ *พลาสโมเดียม ฆาบอดี* AS(Pr_1) เมื่ออินคิวเบตเซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 30 นาโนโมลาร์ในฮีพส์บัฟเฟอร์-ซาลีน pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วสกัด ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์ด้วยเอทธานอล ปรากฏว่าปริมาณสมบูรณ์ของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS, AS(Pr_1) และเซลล์ไม่ติดเชื้อจะมีค่าประมาณ 12.0, 4.9 และ 1.3 พิโคโมลต่อ 10^9 เซลล์ตามลำดับ เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติจะนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์ด้วยขบวนการที่อิ่มตัว (K_m 7.9 $\pm$ 0.1 นาโนโมลาร์) ซึ่งแสดงถึงว่า ไพริเมธามีนน่าจะถูกนำเข้าเซลล์ด้วยขบวนการ carrier-mediated transport แม้ว่าค่าการนำเข้าจะต่ำมากจนไม่สามารถสังเกตความแตกต่างเนื่องจากผลกระทบของอุณหภูมิและ pH ก็ตาม ลักษณะการนำเข้าของไพริเมธามีนโดยเซลล์ติดเชื้อ *พลาสโมเดียม ฆาบอดี* AS จะแปรตาม pH และ อุณหภูมิ โดยที่ไพริเมธามีนจะยังคงผ่านเข้าเซลล์ได้ค่อนข้างดีเช่นกันที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เมื่อพิจารณารวมไปถึงรูปแบบของการนำเข้า ซึ่งแปรตามความเข้มข้นของ

^{14}C-pyrimethamine บ้างเล็กน้อย จึงเป็นไปได้ว่า ไพริเมธามีนน่าจะถูกนำเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS โดยอาศัยขบวนการ carrier-mediated transport (K_m 3.9 $\pm$ 0.7 นาโนโมลาร์) ร่วมกับ simple diffusion ลักษณะการนำเข้าแบบ simple diffusion ของไพริเมธามีนนี้จะเห็นเด่นชัดมากขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) โดยที่การนำเข้าจะไม่ขึ้นกับอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการทดลองที่แสดงว่า การนำเข้าจะแปรตาม pH ซึ่งใช้ทดลอง และรูปแบบของการนำเข้า ไม่แปรตามความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine มากนัก (K_m 6.3 $\pm$ 0.9 นาโนโมลาร์) จึงอาจกล่าวได้ว่า carrier-mediated transport ของไพริเมธามีนยังคงปรากฏอยู่ในเซลล์ติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) แต่จะมีลักษณะแตกต่างจากขบวนการเดียวกันในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS ไปบ้าง ทั้งนี้ผลการทดลองพบว่า pH และกรดโฟลิคจะมีผลกระทบต่อการนำเข้าของไพริเมธามีนต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อทำการศึกษาเซลล์ติดเชื้อทั้งสองโคลนในสภาวะที่ขาดอาหารยังพบอีกว่า การนำเข้าของไพริเมธามีนในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อจะขึ้นกับความเข้มข้นของกลูโคสและชนิดของสารที่เป็นแหล่งพลังงาน กับทั้งถูกยับยั้งได้ด้วย 2,4-ไดไนโตรฟีนอล แสดงผลสรุปถึงความเป็นไปได้ที่การนำเข้าของไพริเมธามีนในเซลล์เม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี จะอาศัยพลังงานบางส่วนโดยผ่านทางขบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน

ผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ 3 ตัวในโฟเลตเมตาบอลิสมของเชื้อทั้งสองโคลน โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งเตรียมได้จากเซลล์อิสระของ พลาสโมเดียม ฆาบอดี ซึ่งแยกออกจากเซลล์ติดเชื้อโดยการทำลายเยื่อเซลล์ติดเชื้อด้วย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนินนาน 10 นาที พบว่า คุณสมบัติทางชีวเคมีและจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากเชื้อต้านยา (โคลน AS (Pr_1)) จะแตกต่างจากเชื้อไม่ต้านยา (โคลน AS) หลายประการ ดังนี้ ค่ายับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 9 เท่าในเชื้อโคลน AS(Pr_1) (ED_{50} 288.4 นาโนโมลาร์) เมื่อเทียบกับโคลน AS (ED_{50} 33.1 นาโนโมลาร์) และไพริเมธามีนจะยับยั้งเอนไซม์ในพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) แบบ non-stoichiometric ส่วนเอนไซม์เดียวกันในพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS การยับยั้งจะเป็นแบบ stoichiometric จากการศึกษาค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของการยับยั้ง (K_i) แสดงว่า เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากพลาสโมเดียม

ชำบอดี AS(Pr_1) (K_i 160 นาโนโมลาร์) จะจับกับไพริเมธามีนได้เลวกว่าเอนไซม์จากเชื้อไม่ต้านยาประมาณ 5.5 เท่า (K_i 30 นาโนโมลาร์) โดยที่จลน์ศาสตร์การยับยั้งของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ในเชื้อโคลน AS(Pr_1) และ AS จะเป็นแบบแข่งขันและไม่แข่งขันตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์จากโคลน AS(Pr_1) สามารถจับกับสับสเตรตไดไฮโดรโฟเลต (K_m 11.8 $\pm$ 0.7 ไมโครโมลาร์) ได้ดีกว่าเอนไซม์เดียวกันของเชื้อโคลน AS (K_m 44.9 $\pm$ 0.6 ไมโครโมลาร์) แอคติวิตีของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่สกัดจากเชื้อไม่ต้านไพริเมธามีนจะถูกกระตุ้นโดยโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ ในขณะที่เอนไซม์ต้านยาไม่ต้องการโปแตสเซียมคลอไรด์เป็นโคแฟคเตอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แยกจากเชื้อโคลน AS(Pr_1) มีค่า 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากเอนไซม์ในพลาสโมเดียม ชำบอดี AS ประมาณ 10 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จากทั้งสองแหล่งจะถูกผลกระทบจาก pH คล้ายคลึงกันโดย pH ที่เหมาะสมสำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ที่ประมาณ pH 5.9 ต่างกันเล็กน้อยตรงที่เอนไซม์ในเชื้อต้านยาถูกยับยั้งได้ด้วยทริสบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ค่าแอคติวิตีสูงสุดต่อ 10^9 เซลล์แสดงให้เห็นว่าการต้านไพริเมธามีนของเชื้อ พลาสโมเดียม ชำบอดี AS(Pr_1) จะปรากฏควบคู่กับการเพิ่มแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส (34.8 $\pm$ 0.6 หน่วย) ขึ้นมากกว่าเชื้อโคลน AS (9.3 $\pm$ 0.2 หน่วย) เกือบ 4 เท่า

การศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสซึ่งสกัดจากพลาสโมเดียม ชำบอดี ทั้งสองโคลน พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างก็จะเป็นช่วงกว้างโดยมีค่ากึ่งกลางที่ pH 8.4 และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในโคลน AS คือ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อโคลน AS(Pr_1) พบว่าเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตจะไม่ต่างกันในเชื้อ พลาสโมเดียม ชำบอดี AS และ AS(Pr_1) สำหรับการเปรียบเทียบแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสต่อ 10^9 เซลล์ ปรากฏว่าในเชื้อต้านไพริเมธามีนจะวัดค่าได้มากกว่าเชื้อไม่ต้านเล็กน้อย และยังพบอีกว่าไพริเมธามีนความเข้มข้นสูงถึง 1.11 มิลลิโมลาร์ (ครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นของ THF) จะไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสแต่อย่างใด

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ในโฟเลตเมตาบอลิสมอีกตัวหนึ่งคือ ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ซึ่งสกัดจากเชื้อพลาสโมเดียมที่ต้านไพริเมธามีนจะถูกกระตุ้นด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ซึ่งไม่ต่างจากเอนไซม์ใน พลาสโมเดียม ชาบอดี AS และ pH จะมีผลกระทบคล้ายคลึงกันต่อเอนไซม์ของทั้งสองโคลน (pH ที่เหมาะสมต่อการวัดแอคติวิตีประมาณ 8.9 - 9.0) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ที่แยกจาก พลาสโมเดียม ชาบอดี AS มีค่าระหว่าง 40 - 45 องศาเซลเซียส แต่จะมีค่า 45 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์เดียวกันใน พลาสโมเดียม ชาบอดี AS (Pr_1) ข้อมูลการศึกษาทางจลน์ศาสตร์ให้ผลพอสรุปได้ว่าความสามารถของเอนไซม์จากเชื้อทั้งสองโคลนต่อการจับกับสับสเตรต (PABA และ DHPP) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่าแอคติวิตีสุทธิสูงสุดต่อ 10^9 เซลล์ของเอนไซม์ที่แยกได้จาก พลาสโมเดียม ชาบอดี AS (Pr_1) มีค่าสูงกว่าที่วัดได้ในเชื้อโคลน AS เล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าไพริเมธามีนความเข้มข้นสูงถึง 0.25 มิลลิโมลาร์ (หนึ่งในสี่ของความเข้มข้นของ DHPP) จะไม่มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จากเชื้อทั้งสองโคลน

ผลการวิจัยให้ข้อสนับสนุนสมมติฐานการออกฤทธิ์ของไพริเมธามีนในการยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมว่า ไพริเมธามีนมีผลกระทบโดยตรงต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

Thesis Title Effects of Pyrimethamine Resistance on the Uptake of Pyrimethamine and Some Folate Metabolizing Enzymes in Plasmodium chabaudi

Name Miss Suporn Nuchadomrong

Thesis Advisor Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Department Biochemistry

Academic Year 1984

Abstract

The studies of mechanism of pyrimethamine resistance were achieved in two clones of Plasmodium chabaudi ; clone AS modeling as drug-sensitive parasites, susceptible to pyrimethamine 15 mg/kg body weight and clone AS(Pr_1) modeling as drug-resistant parasites, susceptible to pyrimethamine 30 mg/kg body weight. ^{14}C-pyrimethamine was used to investigate the process of pyrimethamine uptake in mouse red blood cells infected with pyrimethamine-resistant or with pyrimethamine-sensitive P.chabaudi, as well as in normal red cells. The preliminary data indicated that pyrimethamine uptake was slowest in P.chabaudi AS(Pr_1) infected cells. By ethanol extraction of the uptaken ^{14}C-pyrimethamine ; the absolute intracellular level of ^{14}C-pyrimethamine (at 30 nM drug in HEPES buffer saline pH 7.4 at 37^{o}C for 15 min) was approximately 12.0, 4.9 and 1.3 pmole/10^9 cells for cells infected with clone AS, AS(Pr_1) and uninfected cells respectively. The saturable process of drug uptake by normal red blood cells (K_m 7.9 $\pm$ 0.1 nM) resembled carrier-mediated transport, although it was not shown significantly temperature and

pH dependence according to its low uptake. Considerably, the characteristics of pyrimethamine uptake by P.chabaudi AS infected cells was slightly concentrative yet still remained pH and temperature sensitive together with obviously drug ability to penetrate cells even at low temperature. It was therefore suggested that pyrimethamine was transported across clone AS infected red cell membrane via a combination of two processes : carrier-mediated transport (K_m 3.9 $\pm$ 0.7 nM) and simple diffusion. The simple diffusion process might be distinctly suspected in red cells infected with P.chabaudi AS(Pr_1) owing to its temperature independent. However, the carrier-mediated transport was reasonably still existed in clone AS(Pr_1) infected cells since the experimental data showed pH sensitive and somehow rather non-concentrative pattern (K_m 6.3 $\pm$ 0.9 nM). The carrier-mediated transport of P.chabaudi AS and AS(Pr_1) infected cells could be distinguished from each other by the difference in pH and folic acid effects on drug uptake. Further studies with glucose depleted cells were clearly evident that the ^{14}C-pyrimethamine incorporation of infected cells was dependent on concentration of glucose and various types of substrate. The uptake was shown to be inhibited by 2,4-dinitrophenol. The conclusive data demonstrated the possibility that the mechanism of pyrimethamine uptake in mouse red blood cells infected with P.chabaudi may have been partially energy dependent via oxidative phosphorylation.

The comparative studies of three folate metabolizing enzymes were achieved with crude extract of erythrocyte-free parasites, P.chabaudi AS and AS(Pr_1), obtained from 0.015 % saponin treatment of parasitized cells of the two clones for 10 min. The biochemical

and kinetic properties of dihydrofolate reductase isolated from resistant parasites (clone AS(Pr_1))was remarkably different from sensitive parasites (clone AS). The 50 % inhibitory level of pyrimethamine increased about 9 folds in clone AS(Pr_1) (ED_{50} 288.4 nM) when comparing to clone AS (ED_{50} 33.1 nM). The inhibition of enzyme in P.chabaudi AS(Pr_1) by pyrimethamine was found to be non-stoichiometric in nature, meanwhile in P.chabaudi AS was stoichiometric. Due to K_i for pyrimethamine, it is estimated that the dihydrofolate reductase from P.chabaudi AS(Pr_1) (K_i 160 nM) binds to pyrimethamine approximatly 5.5 times less effective than do the sensitive clone (K_i 30 nM). The kinetic of pyrimethamine inhibition to the enzyme in clone AS(Pr_1) and AS was found to be competitive and non-competitive respectively. The affinity of clone AS(Pr_1) enzyme to substrate DHF (K_m 11.8 $\pm$ 0.7 μM) seemed to be better than clone AS enzyme (K_m 44.9 $\pm$ 0.6 μM). Different from the sensitive clone of which dihydrofolate reductase activity was stimulated by 0.05 M KCl, the resistant enzyme did not need KCl as cofactor. Optimal temperature which was observed at 45 - 50°C for the enzyme isolated from AS(Pr_1) parasites was in the range of 10°C higher than P.chabaudi AS. In spite of the fact that pH optimum for enzyme from both sources was not significantly different (pH 5.9), the resistant enzyme activity was shown to be contrarily inhibited by tris buffer. The maximum total activity/10^9 parasite cells, 9.3$\pm$0.2 enzyme unit in clone AS and 34.8$\pm$0.6 enzyme unit in clone AS(Pr_1), gives an interesting clue that pyrimethamine resistance of P.chabaudi AS(Pr_1) is also associated with an increase in maximum total enzyme activity.

Crude extracts of serine hydroxymethyltransferase from P.chabaudi AS and AS (Pr_1) exhibited similar broad pH optimum centering at 8.4. Clone

AS enzyme showed a sharp optimal temperature at 50°C, whereas the AS(Pr_1) enzyme had a rather broad figure at 50 - 55°C. There were no significant differences in the Michaelis constants for substrates, serine an THF, between enzyme from P.chabaudi AS and AS (Pr_1). The maximum total activity/10^9 parasite cells in pyrimethamine resistant parasite was slightly greater than that in pyrimethamine-sensitive. Pyrimethamine at 1.11 mM (one-half of The concentration) did not exhibit any effect on serine hydroxymethyltransferase from both sources.

The further comparative studies of the folate metabolizing enzyme was extended to the crude extracts of dihydropteroate synthase. The properties of resistant plasmodial enzyme were similar to P.chabaudi AS enzyme in its activation by 0.2 M $MgCl_2$ and pH dependence. Dihydropteroate synthase isolated from P.chabaudi AS showed higher activity in the temperature range of 40 - 45°C, meanwhile the P.chabaudi AS(Pr_1) enzyme had an optimal temperature quite sharp at 45°C. Kinetic data analysis made it possible to conclude that the enzyme from both sources were not different in their affinity to substrates, PABA and DHPP. The maximum total activity/10^9 parasite cells of the enzyme isolated from plasmodium AS(Pr_1) was demonstrated to be slightly higher than clone AS. Pyrimethamine 0.25 mM (one-fourth of DHPP concentration) did not inhibit dihydropteroate synthase activity.

The experimental data confirm the hypothesis of pyrimethamine action on plasmodial growth that dihydrofolate reductase is drug target enzyme.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาให้ความเข้าใจ คำปรึกษารวมทั้งความช่วยเหลือในหลาย ๆ ด้าน ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ และรองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์ ที่กรุณาให้คำแนะนำจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอบคุณสมาคมนิสิตเก่าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับความอนุเคราะห์เรื่องทุนการศึกษา

ขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณามอบเงินทุนวิจัยประจำปี 2525 อุดหนุนการวิจัยนี้

ขอบคุณ คุณอลิสา บูรบรรพ์ คุณอดิศร รัตนพันธุ์ คุณนุชรัตน์ เตียวปิยกุล คุณ สุรสิทธิ์ พลอยตนัย และ คุณสมศักดิ์ เขียวแล่งใส สำหรับความช่วยเหลือด้านการวิจัย

ขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ขอบคุณ คุณนิวัฒน์ คุปต์นิวัฒน์ และภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางภาพถ่ายและเทคโนโลยีทางการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาช่วยเหลือทำภาพถ่ายสไลด์

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบคุณสำหรับมิตรภาพและกำลังใจ จากเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาทุกท่าน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย . . . . . ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ . . . . . จ
กิตติกรรมประกาศ . . . . . ฉ
สารบัญ . . . . . ฉ
รายการตารางประกอบ . . . . . ด
รายการรูปประกอบ . . . . . ต
คำย่อ . . . . . บ

บทที่

1. บทนำ 1
2. วัสดุภัณฑ์ เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ
   - 2.1 วัสดุภัณฑ์ 20
   - 2.2 เคมีภัณฑ์ 20
   - 2.3 เครื่องมือ 22
   - 2.4 สัตว์ทดลอง 23
   - 2.5 สายพันธุ์ของ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี 23
3. วิธีการวิจัย
   - 3.1 วิธีเตรียมสารละลาย 24
   - 3.2 วิธีการเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง 34
   - 3.3 วิธีการทำให้หนูทดลองติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี 34
   - 3.4 วิธีติดตามการเจริญเติบโต และระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ในเม็ดเลือดแดงหนู 34
   - 3.5 วิธีทดสอบความไวของ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ต่อไพริเมธามีน. 35
   - 3.6 วิธีกำจัดเม็ดเลือดขาวออกจากเลือดตัวอย่างเพื่อใช้ทดลองการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine 36

บทที่ หน้า

3.7 วิธีการนับเม็ดเลือดแดงและจำนวนเซลล์ติดเชื้อ 37

3.8 วิธีการศึกษาการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี . . . 37

3.9 วิธีการศึกษาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง 39

3.10 วิธีการเตรียมเอนไซม์จากพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี 40

3.11 วิธีการวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี 41

3.12 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส . . 42

วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส 42

วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส . 43

4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ในหนูไมซ์ . . . 45

4.2 ผลการทดสอบความไวของพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ต่อไพริเมธามีน 48

4.3 ผลกระทบของความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ต่อการนำเข้าสู่เซลล์ 48

4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine 52

4.5 ผลการศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธีการสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง 55

4.6 ผลการศึกษาชนิดของมีเดียมที่เหมาะสมต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine 57

4.7 ผลกระทบของลักษณะการติดเชื้อต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine 61

4.8 ผลการเปรียบเทียบปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี 65

บทที่ หน้า

4.9 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี 67

4.10 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี 67

4.11 ผลกระทบของ pH ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี 69

4.12 ผลกระทบของกรดโฟลิคต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี . 71

4.13 ผลกระทบของสารที่เป็นแหล่งพลังงานต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี 74

4.14 ผลกระทบของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี 77

4.15 ผลกระทบของโซเดียมฟลูออไรด์และโซเดียมอาร์ซีเนตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี 81

4.16 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี อิสระ จากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ 86

4.17 ผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส และไดไฮโดรพเทอโรเอตซินเตส จากพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS(Pr_1)

เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส 88

เอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส 101

เอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส 111

บทที่ หน้า

5. บทสรุปและวิจารณ์ 124

เอกสารอ้างอิง 164

ภาคผนวก

1. Lineweaver-Burk Plot ของการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi 178

2. เส้นกราฟเปรียบเทียบความเปราะของเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (fragility curve) ในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi . 179

3. กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธีเบนซิดีน . . . 180

4. กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนใน 1 เปอร์เซ็นต์ไตรตอน X - 100 โดยวิธีลอรี 181

5. ผลงานวิจัยพิมพ์เผยแพร่เรื่องที่ 1 "The Characteristics of the Pyrimethamine Uptake by Plasmodium chabaudi Infected Red Blood Cells." 182

6. ผลงานวิจัยพิมพ์เผยแพร่เรื่องที่ 2 "Serine hydroxymethyltransferase from Pyrimethamine - Sensitive and Resistant Plasmodium chabaudi." 183

ประวัติผู้เขียน 184

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1. ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้บำบัดโรคมาลาเรีย และระยะการเจริญในวงชีพของพลาสโมเดียมที่ถูกผลกระทบ 11
2. แสดงความแม่นยำของการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งสกัดออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติด้วย 95 เปอร์เซนต์เอทรานอล 59
3. แสดงความแม่นยำของการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งสกัดออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติด้วยกรด 59
4. แสดงผลกระทบของลักษณะการติดเชื้อ P.chabaudi AS ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine 64
5. แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi 68
6. สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจาก P. chabaudi AS และ AS(Pr_1) 102
7. สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส จาก P.chabaudi AS และ AS(Pr_1) 112
8. สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จาก P.chabaudi AS และ AS(Pr_1) 123

รายการรูปประกอบ

รูปที่ หน้า

1. วงชีพของพลาสโมเดียมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 3
2. การสังเคราะห์โคเอนไซม์โฟเลตในพลาสโมเดียมและเซลล์เจ้าเรือนทั่ว ๆ ไป 7
3. สมมติฐานของเตตระไฮโดรโฟเลตเมตาบอลิสมในพลาสโมเดียม 9
4. ก. ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส 15
   ข. ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส 15
5. ปฏิกิริยาของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส 18
6. รูปแบบการเจริญเติบโตของ P.chabaudi AS ในเม็ดเลือดหนูไมซ์ . . . 46
7. ภาพแสดงระยะการเจริญและลักษณะการติดเชื้อของ P.chabaudi AS ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ในวันที่ 3 และวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ . . . 47
8. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อการเจริญเติบโตของ P.chabaudi AS ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ 49
9. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อการเจริญเติบโตของ P.chabaudi AS(Pr_1) ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ 50
10. ผลกระทบของ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้นสูง ๆ ต่อการนำเข้าในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติกับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS . . 51
11. รูปแบบการเจริญของ P.chabaudi AS ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ เมื่ออินคิวเบตเลือดติดเชื้อกับไพริเมธามีนในสภาวะ in vitro 53
12. รูปแบบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS เมื่ออินคิวเบตกับ ^{14}C-pyrimethamine (2 - 100 นาโนโมลาร์) 54
13. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine
   ก. ผลของจำนวนครั้งของการปั่นล้างเซลล์ 56
   ข. ผลของความหนาแน่นของเซลล์ 56
   ค. ผลการหาเวลาที่เหมาะสม 56

รูปที่ หน้า

14. เปรียบเทียบวิธีการล่กัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi 58

15. เปรียบเทียบความสามารถในการรักษาระดับ pH ในระหว่างทำการทดลองการนำเข้า ^{14}C-pyrimethamine ของฟิทซ์มีเดียม และ 20 มิลลิโมลาร์ ฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 60

16. เปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS ในฟิทซ์มีเดียมและฮีพล์บัฟเฟอร์ ซาลีน. 62

17. เปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS ในฮีพล์บัฟเฟอร์ ซึ่งมีองค์ประกอบต่าง ๆ กัน. . 63

18. เปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi 66

19. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi. . . 70

20. ผลกระทบของ pH ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi . . 72

21. ผลกระทบของกรดโฟลิคต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi 73

22. ผลกระทบของกลูโคสต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi 75

23. ผลกระทบของกลูโคสต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi ซึ่งทำให้ขาดอาหาร 76

24. ผลกระทบของไพรูเวตและซัคซิเนตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ P.chabaudi . . 78

25. ผลกระทบของไพรูเวตและซัคซิเนตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ P.chabaudi ซึ่งทำให้ขาดอาหาร 79

รูปที่ หน้า

26. ผลกระทบของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi 82

27. ผลกระทบของโซเดียมฟลูออไรด์ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi 83

28. ผลกระทบของโซเดียมอาร์ซีเนต ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi 85

29. ผลการแยกเซลล์ P.chabaudi AS อิสระ โดยวิธีทำลายเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อด้วย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนิน เมื่อใช้เอนไซม์ไดไฮโดร-โฟเลต รีดักเตส และปริมาณโปรตีนเป็นตัวบ่งชี้ 87

30. เสถียรภาพของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส 89

31. ผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส 90

32. ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส . . . 92

33. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส . . 93

34. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P.chabaudi AS กับสับสเตรตไดไฮโดรโฟเลต 94

35. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P.chabaudi AS(Pr_1) กับสับสเตรตไดไฮโดรโฟเลต 95

36. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P.chabaudi AS 97

37. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P.chabaudi AS(Pr_1) 98

รูปที่ หน้า

38. Dixon Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจาก P.chabaudi AS กับไพริเมธามีน (4-30 นาโนโมลาร์) 99

39. Dixon Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจาก P.chabaudi AS(Pr_1) กับไพริเมธามีน (0.12 - 1.25 ไมโครโมลาร์) 100

40. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทิล-ทรานสเฟอเรส 104

41. ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทิลทราน-สเฟอเรส 105

42. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทิล-ทรานสเฟอเรส 106

43. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทิลทราน-สเฟอเรสกับสับสเตรตเตตระไฮโดรโฟเลต 108

44. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทิลทราน-สเฟอเรสกับสับสเตรต กรดอะมิโนเซอรีน 109

45. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทิล-ทรานสเฟอเรส 110

46. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส 113

47. ผลกระทบของแมกนีเซียมคลอไรด์ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอ-โรเอต ซินเตส 115

48. ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส . 116

49. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส 117

50. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส กับสับสเตรต 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7,8-ไดไฮโดรพ-เทอริดีน ไพโรฟอสเฟต 119

รูปที่ หน้า

51. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส กับสับสเตรตกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค 120

52. ผลกระทบของไพริเมธามีน ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส 121

53. สมมติฐานผลการเปลี่ยนแปลงบางประการที่เยื่อเซลล์ต่อคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม 137

54. สมมติฐานวัฏจักรการสังเคราะห์ไธมิดิลเลตในพลาสโมเดียม 148

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

ACD = acid citrate dextrose

DHF, FH_2 = dihydrofolate

DHFR = dihydrofolate reductase

Dimedon = 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione

dUMP = deoxyuridine monophosphate (deoxyuridylic acid)

dTMP = deoxythymidine monophosphate (deoxythymidylic acid)

FTHFS = formyl - tetrahydrofolate synthase

Glu = glutamate

Gly = glycine

GTP = guanosine triphosphate

HEPES = N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

$H_2Pt\text{-}CH_2O_{PP}$ = 2 -amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine pyrophosphate (DHPP)

HomoCys = homocysteine

Met = methionine

MTHF DH = methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase

NADP = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form

PP_i = pyrophosphate

PABA = para - aminobenzoic acid

Ser = serine

SHMT = serine hydroxymethyltransferase

THF, FH_4 = tetrahydrofolate

TMS = thymidylate synthase