บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน

การศึกษาผลของโลหะหนักต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน กระทำโดยศึกษาผลของโลหะหนักที่ต้องการต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในสภาวะที่มีการสร้าง ATP จาก ADP และ Pi (state 3 respiration) สภาวะที่ ADP ถูกนำไปใช้จนหมด (state 4 respiration) และสภาวะที่ใช้ uncoupling agent เช่น 2,4 dinitrophenol(DNP) กระตุ้นการหายใจ (state 3 u respiration) เมื่อใช้สับสเตรทชนิดต่าง ๆ เช่น glutamate + malate, succinate และ ascorbate + TMPD

1.1 ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียว และเมื่อให้รวมกันต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโตคอนเดรีย และค่า RCI

รูปที่ 15A เป็น tracing ซึ่งแสดงการตอบสนองตามปกติต่อ ADP + Pi ของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง ตัวเลขในวงเล็บ คือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ คำนวณออกมาเป็นจำนวนนาโนอะตอมออกซิเจน/มก.โปรตีน/นาที (natom O /mg protein/min) แสดงกำกับอยู่ทุกระยะของการหายใจ ระยะแรกตามรูป 15 A แสดงอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระจายใน incubation medium ที่มี glutamate + malate ในปริมาณที่มากเกินพอ เป็นสับสเตรทเรียกระยะนี้ว่า state 4 respiration และอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้ต่ำ (13.70) เมื่อเติม ADP + Pi ลงไป ADP และ Pi จะถูกนำไปใช้ในการสร้าง ATP อัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้น (93.94) เพราะไมโตคอนเดรียนำพลังงานจากการออกซิไดซ์สับสเตรทไปสร้าง ATP ซึ่งเรียกระยะนี้ว่า state 3 respiration เนื่องจากอัตราการหายใจจะเพิ่มขึ้น เมื่อเติม ADP และอัตราการหายใจจะ

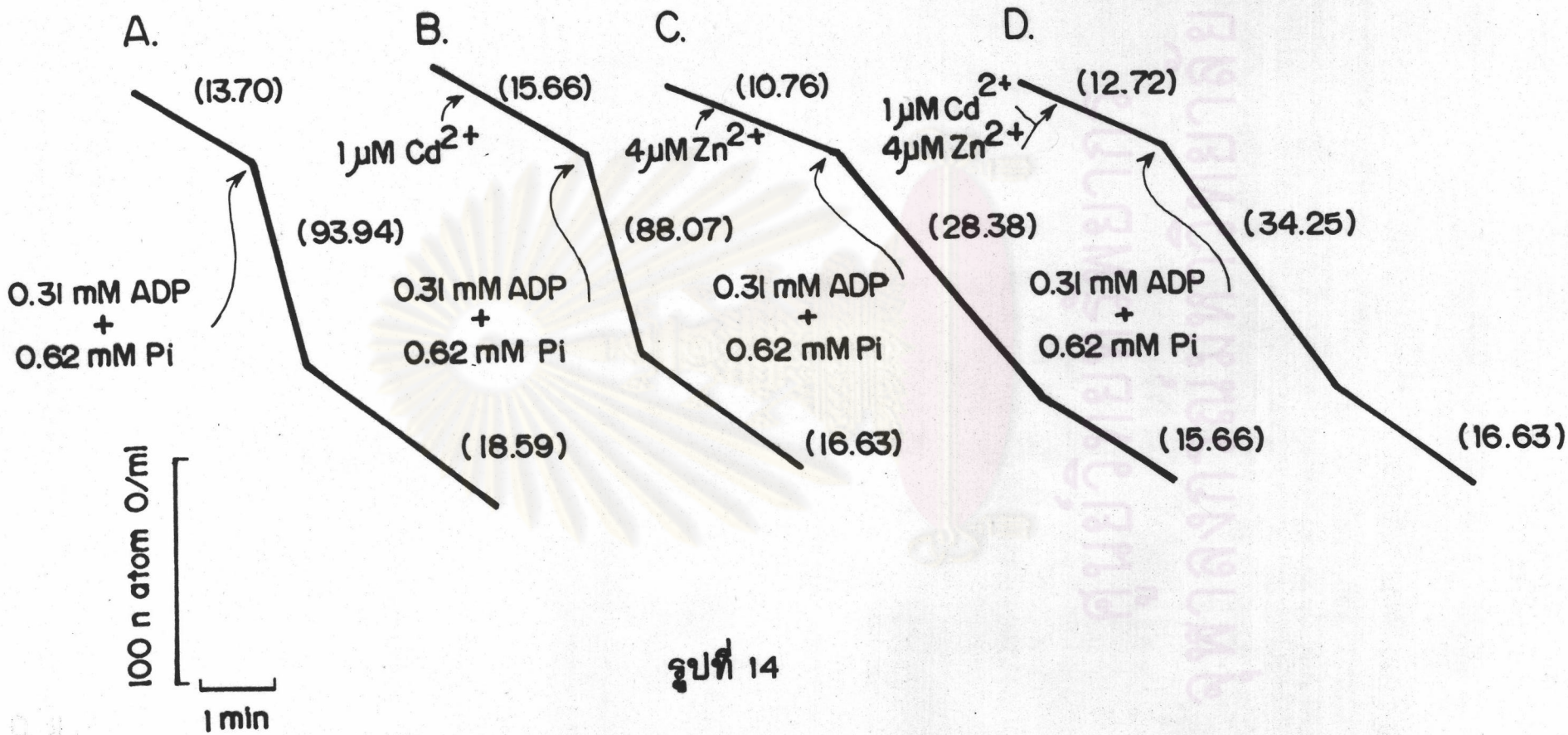
รูปที่ 14

ตัวอย่าง tracing แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อ state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

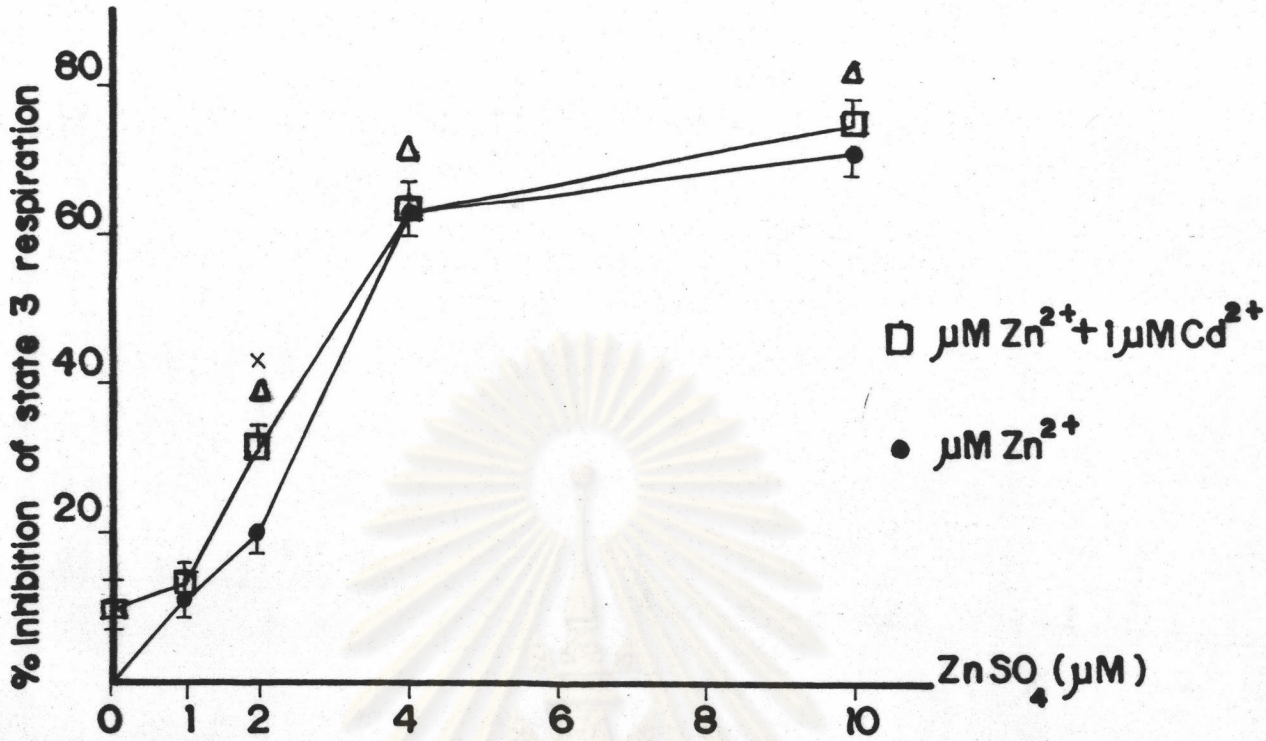
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 2.7 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บ คือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ มีหน่วยเป็น นอ.ออกซิเจน/มก.โปรตีน/นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A.
B.
C.
D.
(13.70)
(15.66)
(10.76)
(12.72)
1 μM Cd2+
4 μM Zn2+
1 μM Cd2+
4 μM Zn2+
(93.94)
(88.07)
(28.38)
(34.25)
0.31 mM ADP
+
0.62 mM Pi
0.31 mM ADP
+
0.62 mM Pi
0.31 mM ADP
+
0.62 mM Pi
0.31 mM ADP
+
0.62 mM Pi
(18.59)
(16.63)
(15.66)
(16.63)
100 n atom O/ml
1 min

รูปที่ 14



รูปที่ 15

ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อ state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate 0.31 mM ADP + 0.62 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 2.03 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

△ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

X $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของสังกะสีที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

ตารางที่ 1

ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกันต่อค่า RCI และอัตราการหายใจใน state 3 และ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

additions	RCI	rate of respiration (natom O/mg protein/min)	
		state 3	state 4
control	5.79±0.37	121.73±10.12	20.52±1.29
1 μM Cd^{2+}	5.59±0.26	107.28±7.94	19.31±1.73
4 μM Zn^{2+}	2.63±0.29	45.05±5.86	17.00±0.46
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	2.33±0.10$^{\Delta}$	42.62±5.17$^{\Delta}$	18.15±1.62

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.76 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

$^{\Delta}$ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

ช้าลงเมื่อไม่มี ADP แสดงว่าไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiration control) และ อัตราการหายใจถูกควบคุมโดยปริมาณของ ADP (1) เมื่อ ADP ถูกนำไป phosphorylate จนหมด อัตราการใช้ออกซิเจนจะช้าลง (18.59) เข้าสู่ state 4 respiration อีกครั้ง สามารถหาค่า respiratory control ratio (RCR) หรือ respiratory control index (RCI) ได้จากการคำนวณอัตราการหายใจใน state 3 หารด้วยอัตราการหายใจใน state 4 ซึ่งค่า RCI สามารถบ่งชี้คุณภาพของไมโตคอนเดรียว่าเป็น tightly coupled mitochondria หรือไม่ จากรูป 15A RCI = 93.94/18.59 = 5.05

ตามรูปที่ 15B และ C แสดงผล การยับยั้งกระบวนการหายใจ (state 3 respiration) ของแคดเมียม 1μM และสังกะสี 4 μM ตามลำดับ พบว่า สังกะสีสามารถยับยั้งการหายใจใน state 3 ได้มากกว่าแคดเมียมโดยอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 28.38 และ 88.07 ตามลำดับ

ส่วน รูปที่ 15 D แสดงผลการยับยั้งการหายใจเมื่อให้แคดเมียมร่วมกับสังกะสี พบว่า อัตราการใช้ออกซิเจน (34.25) น้อยกว่า เมื่อให้แคดเมียมอย่างเดียว แต่มากกว่าเมื่อให้สังกะสีอย่างเดียวเล็กน้อย

รูปที่ 16 ทำการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 1 ได้ทำการทดลองเพิ่มเป็น 4 การทดลอง โดยใช้แคดเมียมความเข้มข้น 1 μM ร่วมกับสังกะสีความเข้มข้น 1-10 μM หาค่าเฉลี่ยเป็นเปอร์เซนต์ในการยับยั้ง state 3 respiration พร้อมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กรณีเปรียบเทียบแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับการให้รวมกันของแคดเมียมและสังกะสี ถ้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ และกรณีเปรียบเทียบสังกะสีที่ให้อย่างเดียวกับการให้รวมกันของแคดเมียมและสังกะสี ถ้าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแสดงด้วยเครื่องหมาย X ผลการทดลองพบว่าสังกะสีที่ให้อย่างเดียวที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย สามารถยับยั้ง state 3 respiration เปอร์เซนต์การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสังกะสีที่เพิ่มขึ้น เมื่อให้แคดเมียมความเข้มข้น 1 μM ร่วมกับสังกะสีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเปอร์เซนต์ของการยับยั้งเพิ่มตามความเข้มข้นของสังกะสีที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ผลการยับยั้งระหว่างแคดเมียม 1 μM ที่ให้อย่างเดียวกับแคดเมียมที่ให้ร่วมกับสังกะสีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อความเข้มข้นของสังกะสี

ตารางที่ 2

ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อ state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียว และให้รวมกัน เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

additions	% inhibition of state 3 respiration		
	NO DTT	DTT before heavy metal	DTT after heavy metal
1 μM Cd^{2+}	13.00±3.80	2.67±4.17	8.63±3.49
4 μM Zn^{2+}	64.12±2.25	24.95±4.31*	27.36±4.79*
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	64.04±3.25	27.94±4.21*	32.03±2.47*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.98 mM DTT, 0.31 mM ADP + 0.62 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.76 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที กรณีใส่ DTT เติมก่อนหรือหลังใส่โลหะหนัก 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการได้รับ DTT และไม่ได้รับ DTT

เท่ากับ 2 ถึง 10 μM แสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งระหว่างสังกะสีที่ให้อย่างเดียวกับแคดเมียมที่ให้ร่วมกับสังกะสี พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของสังกะสีเท่ากับ 2 μM แสดงด้วยเครื่องหมาย X

ตารางที่ 1 แสดงค่า RCI และอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 respiration เมื่อใช้แคดเมียมความเข้มข้น 1 μM หรือสังกะสีความเข้มข้น 4 μM และเมื่อให้รวมกัน โดยใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง พบว่าทั้งแคดเมียมและสังกะสีสามารถลดการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ได้ แต่สังกะสีที่ให้อย่างเดียวลดการใช้ออกซิเจนใน state 3 ได้มากกว่าแคดเมียม (45.05±5.86 และ 107.28±7.94 ตามลำดับ) เมื่อให้โลหะหนักรวมกันลดอัตราการใช้ออกซิเจนได้เพิ่มขึ้น (42.60±5.17) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวแสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ กรณีเปรียบเทียบกับสังกะสีที่ให้อย่างเดียวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลต่อ state 4 respiration ซึ่งหมายถึงระยะหลังจากที่ ADP ถูกนำไป phosphorylated จนหมด สังกะสีลดการใช้ออกซิเจนได้มากกว่าแคดเมียม (17.00±0.46 และ 19.31±1.73 ตามลำดับ) เมื่อให้โลหะหนักรวมกัน อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration นี้ เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (18.15±1.62) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียม หรือสังกะสีที่ให้อย่างเดียว

กรณีค่า RCI ผลการทดลองคล้ายกับผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 คือ ทั้งแคดเมียมและสังกะสีทำให้ค่า RCI มีแนวโน้มลดลง เมื่อให้รวมกัน ค่า RCI ลดลงเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ กรณีเปรียบเทียบกับสังกะสีที่ให้อย่างเดียวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

1.2 ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อ state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียม 1 μM และสังกะสี 4 μM ที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน เมื่อให้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท แสดงในตารางที่ 2

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองของ

ตารางที่ 3

ผลของ ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) ต่อ state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

additions	% inhibition of state 3 respiration		
	NO EDTA	EDTA before heavy metal	EDTA after heavy metal
1 μM Cd^{2+}	13.00±3.80	3.19±4.62	10.45±2.61
4 μM Zn^{2+}	64.12±2.25	7.58±0.62*	14.89±4.51*
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	64.04±3.25	12.35±1.82*	16.57±4.96*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.98 mM EDTA, 0.31 mM ADP + 0.63 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.76 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที กรณีใส่ EDTA เติมก่อนหรือหลังใส่โลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการได้รับ EDTA และไม่ได้รับ EDTA

เปอร์เซนต์การยับยั้ง โดยโลหะหนักต่อ state 3 respiration กรณีได้รับ DTT (ซึ่งเป็นสารที่ป้องกัน -SH group) ก่อนหรือหลังได้รับโลหะหนักเปรียบเทียบกับไม่ได้รับ DTT เป็นการศึกษาความสามารถของสารที่ป้องกัน -SH group ในการป้องกันและแก้ไขฤทธิ์ของโลหะหนักต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย จากการทดลองพบว่า 0.98 mM DTT ลดการยับยั้งการหายใจโดยสังกะสีที่ให้อย่างเดียว และเมื่อให้โลหะหนักร่วมกันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งกรณีให้ DTT ก่อนและหลังได้รับโลหะหนัก แสดงด้วยเครื่องหมาย * DTT มีแนวโน้มที่จะลดการยับยั้งการหายใจโดยแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวได้เมื่อให้ DTT ก่อนแคดเมียม

1.3 ผลของ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ต่อ state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียม 1 μM และสังกะสี 4 μM ที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทแสดงในตารางที่ 3

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองของเปอร์เซนต์การยับยั้งของโลหะหนักต่อ state 3 respiration กรณีได้รับ EDTA (ซึ่งเป็น chelating agent) ก่อนหรือหลัง โลหะหนักเปรียบเทียบกับไม่ได้รับ EDTA เป็นการศึกษาความสามารถของ chelating agent ในการป้องกันและแก้ไขฤทธิ์ของโลหะหนักต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย จากตารางพบว่า 0.98 mM EDTA ลดการยับยั้งการหายใจโดยสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้ร่วมกับแคดเมียมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งกรณีให้ EDTA ก่อนและหลังได้รับโลหะหนักแสดงด้วยเครื่องหมาย * และมีแนวโน้มที่จะลดการยับยั้งโดยแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวได้เมื่อให้ EDTA ก่อนแคดเมียม

1.4 อิทธิพลของ Mg^{2+} ต่อผลของแคดเมียม 1 μM และสังกะสี 4 μM ที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันที่มีต่อค่า RCI และ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท แสดงในตารางที่ 4

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองของค่า RCI และเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงของ state 3 respiration จากตาราง ค่า RCI ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Mg^{2+} เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงของ state 3 respiration พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในกรณี

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4

ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อค่า RCI และ state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเปรียบเทียบระหว่าง medium ที่มี high Mg^{2+} และ no Mg^{2+} เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

additions	RCI		% change of state 3 respiration	
	no Mg^{2+}	high Mg^{2+}	no Mg^{2+}	high Mg^{2+}
control	3.72±0.098	4.24±0.31	-	-
1 μM Cd^{2+}	3.89±0.19	4.11±0.24	+3.70±3.34	-6.54±2.68
4 μM Zn^{2+}	3.26±0.07	3.12±0.08	-13.79±3.77	-29.46±6.18
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	3.22±0.09	2.95±0.12	-15.08±1.33	-35.47±5.60 $^{\Delta}$

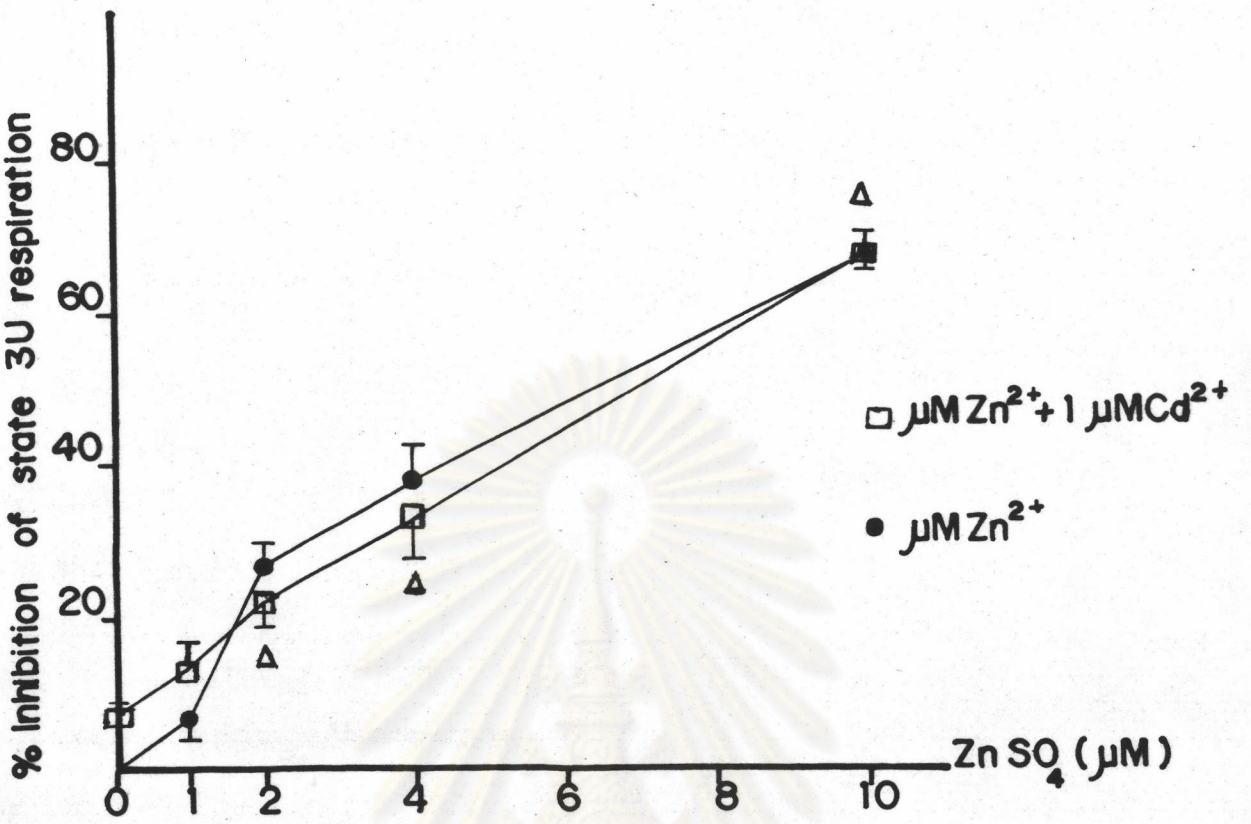
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, (กรณี no Mg^{2+} เติม 90.56 mM KCl ส่วนกรณี high Mg^{2+} เติม 5.63 mM $MgCl_2$ และ 80.60 mM KCl), 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 0.31 mM ADP + 0.63 mM potassium phosphate, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.92 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

เครื่องหมาย + แสดงว่าโลหะหนักกระตุ้น state 3 respiration

เครื่องหมาย - แสดงว่าโลหะหนักกระตุ้น state 4 respiration

$^{\Delta}$ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง high Mg^{2+} และ no Mg^{2+}



รูปที่ 16

ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อ state 3 u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 13.02 mM sucrose, 5.21 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.79 มก. โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง pre-incubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

▵ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

ตารางที่ 5

ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อ state 3 u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate, succinate และ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท

additions	% inhibition of state 3 u respiration		
	glutamate+malate	succinate	ascorbate + TMPD
1 μM Cd^{2+}	5.48±2.12	14.26±4.78	4.78±2.04
4 μM Zn^{2+}	30.48±5.28	49.38±4.62	6.01±3.86
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	34.72±7.34$^{\Delta}$	51.06±2.27$^{\Delta}$	4.93±1.66
10 μg rotenone	94.66±1.73	-	-
10 μg antimycin	-	92.59±2.66	-

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate หรือ 1.88 mM potassium succinate หรือ 3.96 M ascorbate + 0.99 mM TMPD, 5.21 mM DNP, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.65 มก. โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

$^{\Delta}$ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

แคดเมียมรวมกับสังกะสีแสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ ส่วนกรณีให้แคดเมียมอย่างเดียวใน medium ชนิด no Mg^{2+} พบว่าแคดเมียมกระตุ้น state 3 respiration และถ้าใน medium มี high Mg^{2+} แคดเมียมกลับยับยั้ง state 3 respiration แต่การเปลี่ยนแปลงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

1.5 ผลต่อ state 3u respiration ของแคดเมียม 1 µM และสังกะสี 1-10 µM ที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน รูปที่ 16 แสดงเปอร์เซนต์การยับยั้งการหายใจ state 3 u respiration โดยที่ใช้ DNP เป็นตัวกระตุ้นการหายใจ และใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท พบว่าสังกะสียับยั้งการหายใจ state 3 u respiration ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเมื่อให้รวมกับแคดเมียม 1 µM การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสังกะสีที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่สังกะสีความเข้มข้น 2-10 µM แสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ กรณีเปรียบเทียบกับสังกะสีที่ให้อย่างเดียวพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 ทำการทดลองทำนองเดียวกับรูปที่ 3 แต่ใช้ความเข้มข้นของแคดเมียม 1 µM และสังกะสี 4 µM ให้อย่างเดียว และให้รวมกัน เมื่อใช้ glutamate + malate, succinateและ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองของเปอร์เซนต์การยับยั้ง state 3 u respiration โดยใช้ DNP เป็นตัวกระตุ้นการหายใจ

กรณีใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท แคดเมียมยับยั้งการหายใจที่กระตุ้นโดย DNP ได้เล็กน้อย (5.48±2.12%), สังกะสีที่ให้อย่างเดียวยับยั้งได้เพิ่มขึ้นเป็น 30.48±5.28% และเมื่อให้โลหะหนักร่วมกันยับยั้งได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสังกะสีที่ให้อย่างเดียวเมื่อเปรียบเทียบกับ rotenone ที่เป็น site I inhibitor พบว่า rotenone สามารถยับยั้ง state 3 u respiration ได้มากกว่าโลหะหนักที่ได้รับรวมกันประมาณ 3 เท่า

ตารางที่ 6

ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH, succinate และ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท

additions	% inhibition of respiration		
	NADH	succinate	ascorbate + TMPD
1 μM Cd^{2+}	1.90±3.25	9.06±3.62	3.23±2.29
4 μM Zn^{2+}	40.01±4.08	51.51±5.49	5.91±1.77
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	49.28±2.78 Δ	57.56±7.91 Δ	8.78±2.41
10 μg rotenone	75.32±3.10	-	-
10 μg antimycin	-	87.37±4.06	-

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 28.03 mM KCl, 0.99 mM NADH หรือ 1.88 mM potassium succinate หรือ 3.96 M ascorbate + 0.99 mM TMPD, 1.3 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.48 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

Δ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรทผลการทดลองทำนองเดียวกันใช้ glutamate + malate เปอร์เซนต์การยับยั้งเพิ่มขึ้น ทั้งกรณีได้โลหะหนักอย่างเดียวและรวมกัน แคดเมียมที่ให้อย่างเดียวยับยั้งได้น้อยกว่าสังกะสีที่ให้อย่างเดียว แต่เมื่อให้รวมกันสามารถยับยั้งได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมอย่างเดียวพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงด้วยเครื่องหมาย ▵ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสังกะสีอย่างเดียวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ antimycin ซึ่งเป็น site II inhibitor พบว่า antimycin ยับยั้ง state 3 u respiration ได้มากกว่าโลหะหนักรวมกันประมาณ 2 เท่า

กรณีใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท แคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและเมื่อให้รวมกัน ยับยั้งการหายใจ state 3 u respiration ได้เพียงเล็กน้อย และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

1.6 ผลของแคดเมียม 1 µM และสังกะสี 4 µM เมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการหายใจของ osmotic - shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH, succinate และ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรทแสดงในตารางที่ 6

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองของเปอร์เซนต์ยับยั้งการหายใจ โดยใช้ osmotic - shocked mitochondria เพื่อเพิ่ม permeability ของ inner membrane ทำให้สับสเตรทและอิออนต่าง ๆ เคลื่อนผ่านผนังไมโตคอนเดรียอย่างอิสระ (7) และเกิดสภาวะ uncouple โดยไม่ต้องใช้ uncoupler

เมื่อใช้ NADH เป็นสับสเตรท แคดเมียม 1 µM ยับยั้งการหายใจได้เล็กน้อย สังกะสี 4 µM ยับยั้งการหายใจได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อให้รวมกันยับยั้งการหายใจได้เพิ่มขึ้นอีก เมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงด้วยเครื่องหมาย ▵ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสังกะสีที่ให้อย่างเดียว ทดลองใช้ 10µs rotenone ยับยั้งการหายใจได้มากกว่าให้โลหะหนักร่วมกันประมาณ 1.5 เท่า

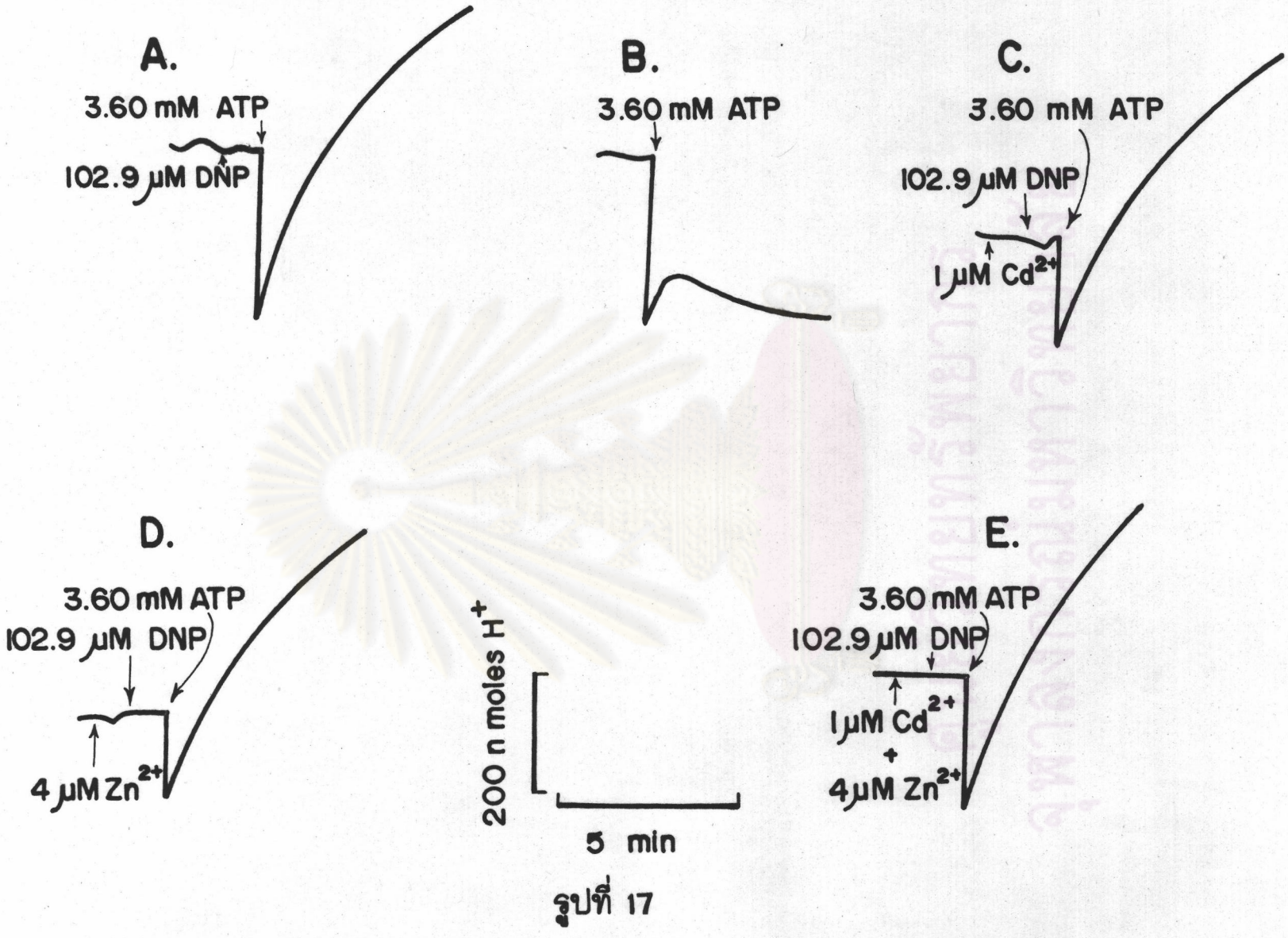
เมื่อเปลี่ยนสับสเตรทเป็น succinate เปอร์เซนต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นมากกว่าใช้ NADH เป็นสับสเตรททั้งกรณีได้รับโลหะหนักเพียงอย่างเดียวและได้รับรวมกัน การให้รวมกัน

รูปที่ 17

ตัวอย่าง tracing แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ในไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นด้วย DNP

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 44.12 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM $MgCl_2$, 104.31 mM KCl, 102.9 µM 3.6 mM ATP, 14.71 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.24 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป ปริมาตรรวมทั้งหมด 3.4 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A.
3.60 mM ATP
102.9 µM DNP
B.
3.60 mM ATP
C.
3.60 mM ATP
102.9 µM DNP
1 µM Cd2+
D.
3.60 mM ATP
102.9 µM DNP
4 µM Zn2+
200 n moles H+
5 min
E.
3.60 mM ATP
102.9 µM DNP
1 µM Cd2+
+
4 µM Zn2+

รูปที่ 17

ตารางที่ 7

ผลของแคดเมียมและสังกะสี เมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้น และไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

additions	ATPase activity (n moles H^+/mg protein/5 min)	
	no DNP	DNP
control	50.30±11.66	499.09±84.35
1 μM Cd^{2+}	38.79±10.61	457.15±82.58
4 μM Zn^{2+}	38.95±7.12	482.18±81.09
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	25.92±5.81	451.49±69.11

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 44.12 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM $MgCl_2$, 104.31 mM KCl, 14.71 mM sucrose, 3.6 mM ATP, (กรณีใช้ DNP กระตุ้นเติม 102.9 μM DNP) และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.97 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 3.4 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

ยับยั้งได้มากกว่าการให้แคดเมียมอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญแสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการได้รับสังกะสีอย่างเดียว เมื่อใช้ 10 μg antimycin ยับยั้งได้มากกว่าการได้รับโลหะหนักรวมกันประมาณ 1.5 เท่า

กรณีใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท แคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและเมื่อให้รวมกันยับยั้งการหายใจได้เล็กน้อยและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2. ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ในไมโตคอนเดรีย

2.1 ผลของแคดเมียม 1 μM และสังกะสี 4 μM เมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP และไม่กระตุ้นด้วย DNP

รูปที่ 17 เป็นตัวอย่าง tracings แสดงผลของแคดเมียม 1 μM หรือสังกะสี 4 μM ที่ให้อย่างเดียวและการให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ที่ใช้ DNP เป็นตัวกระตุ้นในการทดลองนี้การวัด ATPase activity กระทำโดยการวัดปริมาณ H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium เมื่อ ATP ถูก hydrolyse เส้น tracing ที่เคลื่อนที่ขึ้นลงหรือเคลื่อนที่ลงแสดงว่าความเข้มข้นของ H^+ ใน medium เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามลำดับ ส่วนตารางที่ 7 แสดงผลของโลหะหนักต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ที่ถูกกระตุ้นหรือไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP ทำการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 4 เพิ่มการทดลองเป็น 4 การทดลอง ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง จากการทดลองพบว่าโลหะหนักที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันมีแนวโน้มยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ที่ DNP และไม่ใช้ DNP เป็นตัวกระตุ้น แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการให้โลหะหนักอย่างเดียว และการให้โลหะหนักรวมกัน นอกจากนั้นยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่าง ATPase activity ของ control และการได้รับโลหะหนัก

2.2 ผลของแคดเมียม 1 μM และสังกะสี 4 μM เมื่อให้อย่างดียวและให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase เมื่อใช้ osmotic-shocked mitochondria ทำการ

ตารางที่ 8

ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ของ osmotic-shocked mitochondria

additions	ATPase activity (n moles H^+/mg protein /5 min)
control	300.41±31.90
1 μM Cd^{2+}	264.24±28.89
4 μM Zn^{2+}	270.55±26.33
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	269.45±31.12

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 44.12 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM $MgCl_2$, 104.31 mM KCl, 1.47 mM sucrose, 3.6 mM ATP, และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.87 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 3.4 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทดลองทำนองเดียวกับ 2.1 แต่ใช้ osmotic-shocked mitochondria การทำ osmotic shock เป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่ม permeability ของเมมเบรนชั้นใน ซึ่งส่งผลให้เกิดสภาวะ uncouling โดยไม่จำเป็นต้องใส่ uncoupler และทำให้การขนส่ง ATP ผ่านเมมเบรนชั้นในเป็นไปอย่างอิสระ ผลการทดลองได้แสดงในตารางที่ 8 ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองผลของการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองในตารางที่ 7 กล่าวคือ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการได้รับโลหะหนักอย่างเดียวและรวมกันและระหว่าง control กับการได้รับโลหะหนัก

3. ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม

3.1 ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียมเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

รูปที่ 18 เป็นตัวอย่าง tracings ที่แสดงผลของแคดเมียม 1 µM และสังกะสี 4 µM ที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดย Ca^{2+}

รูปที่ 18 A แสดงการตอบสนองตามปกติของไมโตคอนเดรียต่อการเติม $CaCl_2$ ใน medium ที่มีสับสเตรท และ inorganic phosphate อยู่ด้วย ในระยะแรกอัตราการใช้ออกซิเจนช้า (17.15) เมื่อใส่ $CaCl_2$ เข้าไป อัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (146.63) เนื่องจากมีการขนส่ง Ca^{2+} เข้าไปสะสมในไมโตคอนเดรีย ซึ่งจำเป็นต้องใช้พลังงาน เมื่อสะสม Ca^{2+} ได้หมด อัตราการใช้ออกซิเจนก็ลดลง (16.29)

รูปที่ 18B, C แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวต่อการหายใจที่กระตุ้นด้วย Ca^{2+} พบว่า การให้แคดเมียมอย่างเดียว มีผลลดอัตราการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+} บ้าง (127.77) เมื่อให้สังกะสีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลง (68.6) มากกว่าเมื่อให้แคดเมียม นอกจากนั้นปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปยังลดลงอย่างชัดเจน

รูปที่ 18 D แสดงผลการยับยั้งการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียมเมื่อได้โลหะหนักรวมกัน ซึ่งให้ผลคล้ายกับการให้สังกะสีแต่เพียงอย่างเดียว

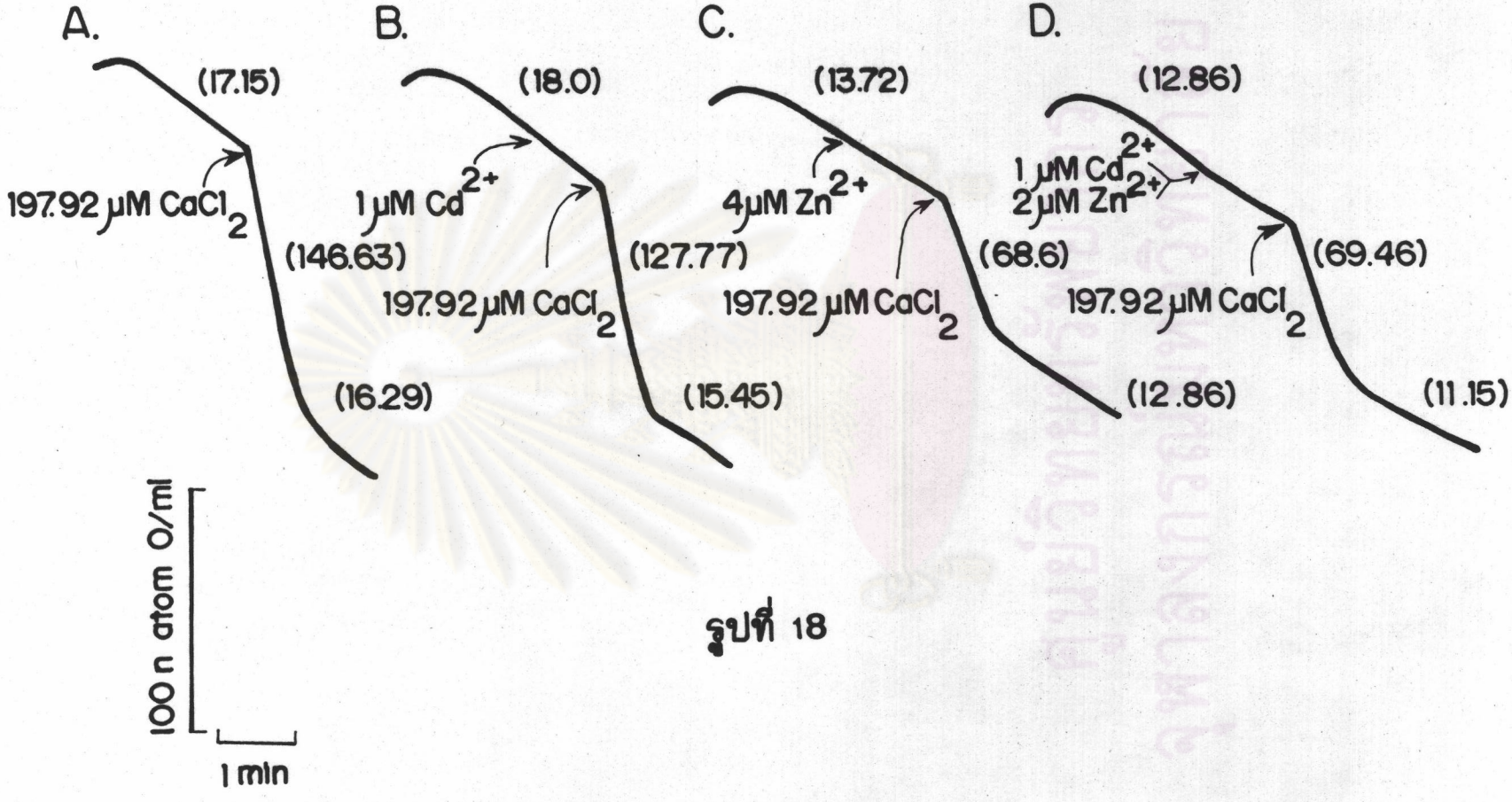
รูปที่ 18

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 0.94 mM potassium phosphate, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 197.92 µM $CaCl_2$, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.08 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในตาราง preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บ คือ อัตราการใช้ออกซิเจน มีหน่วยเป็น นอ.ออกซิเจน/มก.โปรตีน/นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A.
(17.15)
197.92 µM CaCl2
(146.63)
(16.29)
B.
(18.0)
1 µM Cd2+
197.92 µM CaCl2
(127.77)
(15.45)
C.
(13.72)
4µM Zn2+
197.92 µM CaCl2
(68.6)
(12.86)
D.
(12.86)
1 µM Cd2+
2µM Zn2+
197.92 µM CaCl2
(69.46)
(11.15)
100 n atom O/ml
1 min

รูปที่ 18

รูปที่ 19

ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

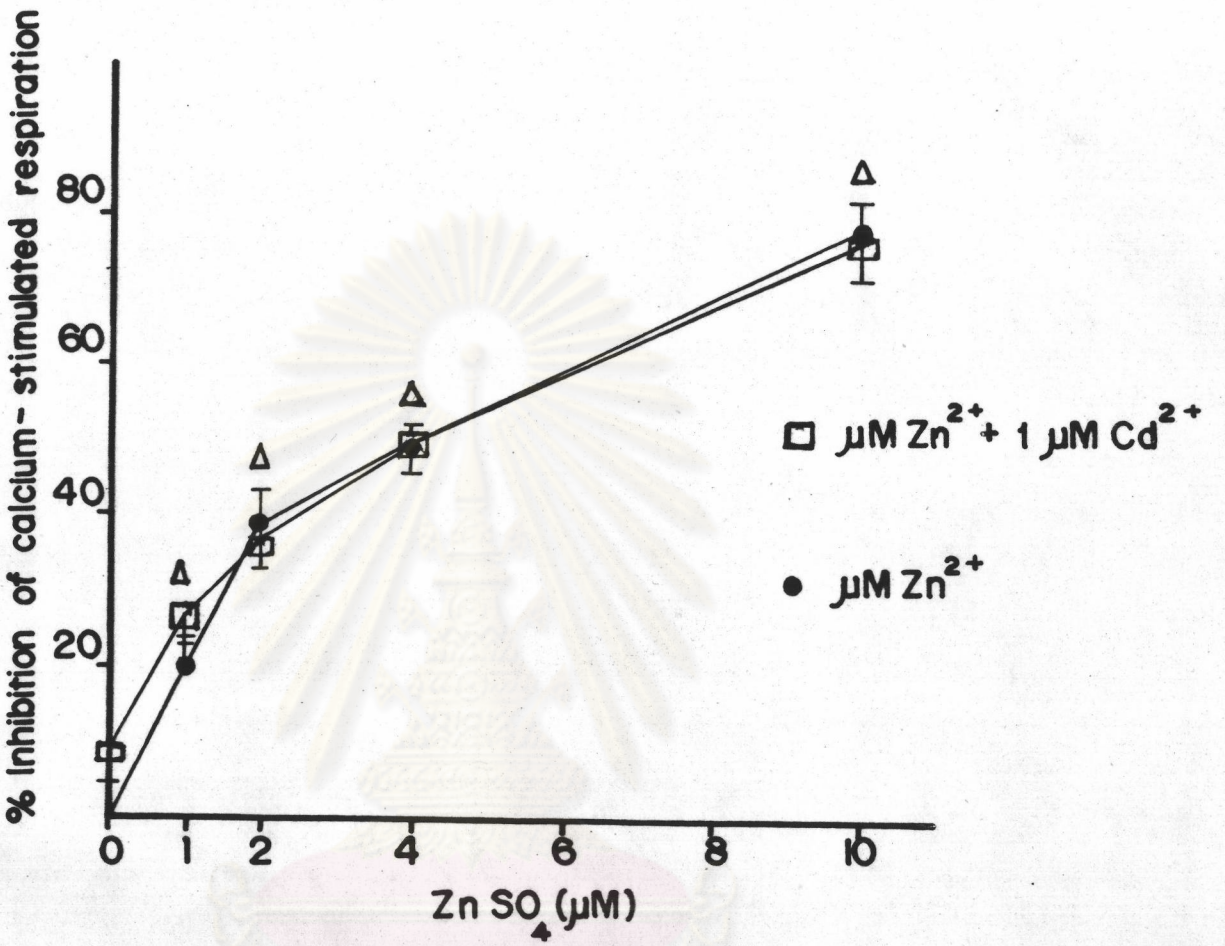
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 0.94 mM potassium phosphate, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 197.92 µM $CaCl_2$, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 4.65 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

Δ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

X $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของสังกะสีที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20

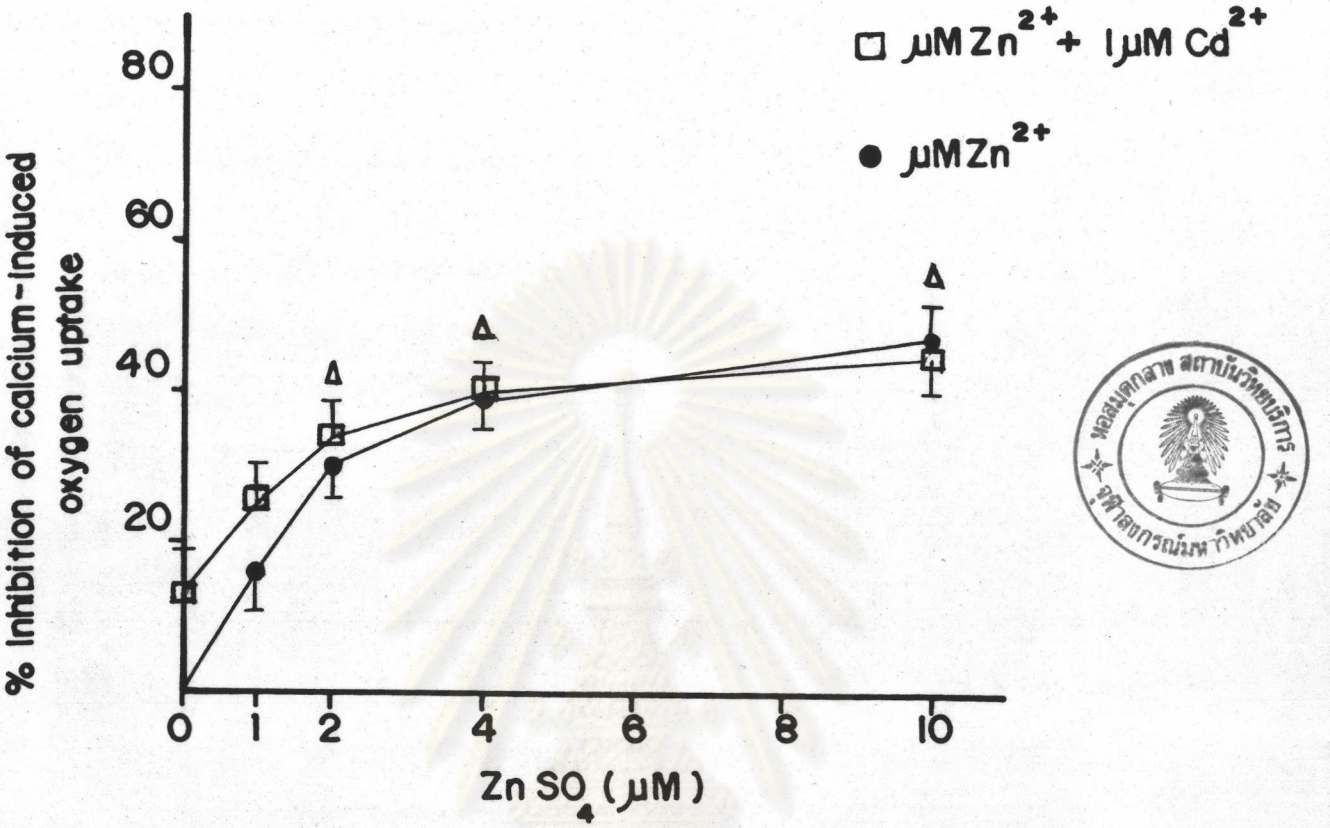
ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อปริมาณการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 0.94 mM potassium phosphate, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 197.92 µM $CaCl_2$, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.35 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดแทนค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

▵ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบผลของแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวกับผลของแคดเมียมร่วมกับสังกะสี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9

ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อการออกฤทธิ์ของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

additions	% inhibition of calcium-stimulated respiration		
	no DTT	DTT before heavy metal	DTT after heavy metal
1 μM Cd^{2+}	6.53±3.83	9.53±4.88	2.07±7.60
4 μM Zn^{2+}	44.12±4.92	24.79±4.78*	22.19±6.91*
1 μM Cd^{2+} plus 4 μM Zn^{2+}	46.89±4.74	22.48±5.82*	26.55±7.47*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 37.2 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl, 0.94 mM potassium phosphate, 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate, 197.92 μM $CaCl_2$, 0.98 mM DTT, 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.91 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป preincubate ไมโตคอนเดรียกับโลหะหนักนาน 1 นาที กรณีใส่ DTT เติมก่อนหรือหลังโลหะหนัก 1 นาที ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลอง

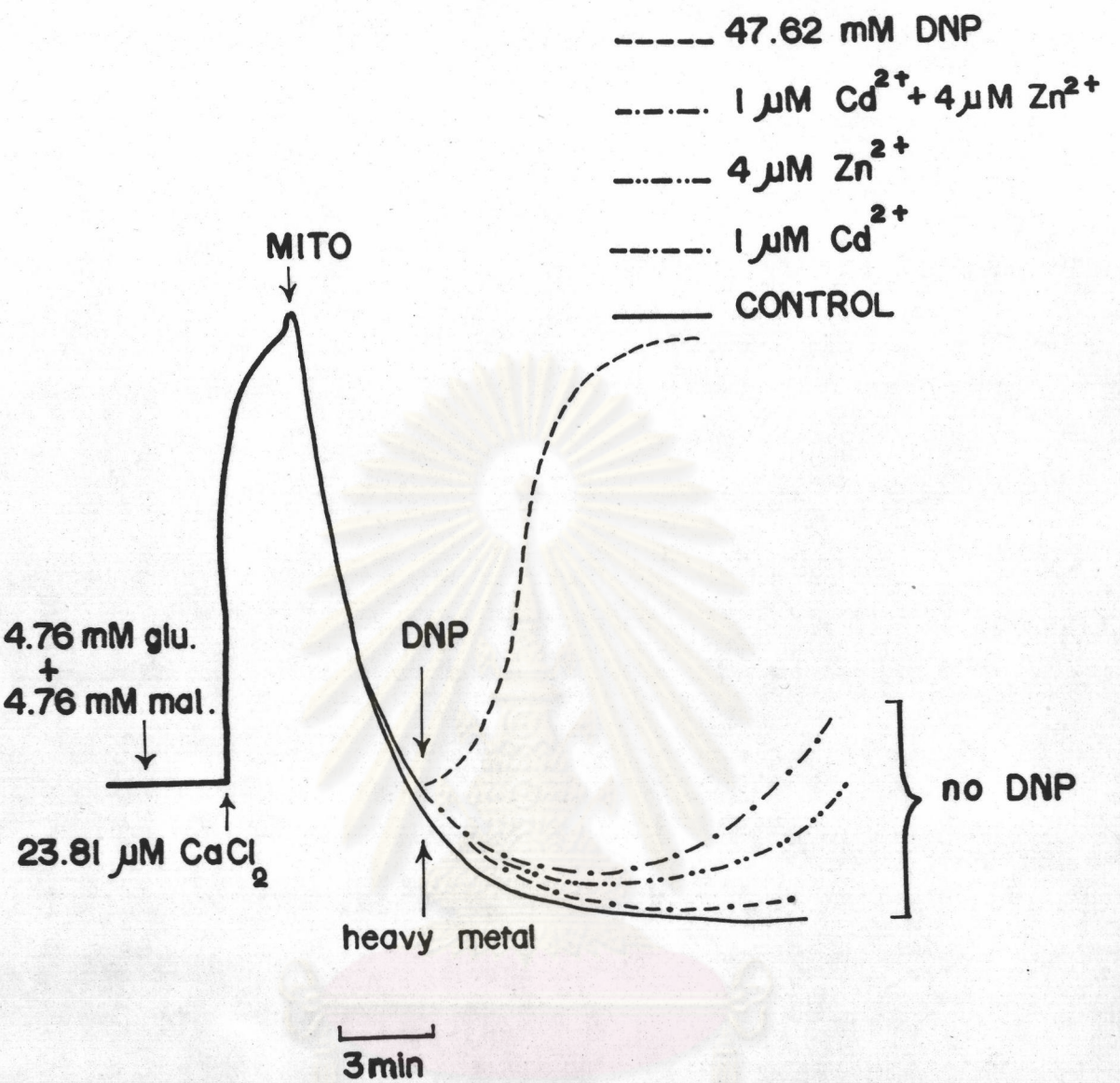
* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการได้รับ DTT และไม่ได้รับ DTT

รูปที่ 19 แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีต่ออัตราการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียม ทำการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 18 ใช้แคดเมียม 1 μM หรือสังกะสี 1-10 μM ให้อย่างเดียวและรวมกัน เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท ค่าในรูปแสดงว่าค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองของเปอร์เซนต์การยับยั้งอัตราการหายใจที่กระตุ้นใจโดยแคลเซียม ผลการทดลองพบว่า สังกะสีที่ให้อย่างเดียวยับยั้งอัตราการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียมได้เพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้นของสังกะสีที่เพิ่มขึ้น เมื่อให้แคดเมียมร่วมด้วย พบว่าการยับยั้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียว แสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสังกะสีที่ให้อย่างเดียวไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

รูปที่ 20 แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อปริมาณการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม ทำการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 18 วัดปริมาณการใช้ออกซิเจนที่กระตุ้นโดยแคลเซียม ใช้แคดเมียม 1 μM หรือสังกะสี 1-10 μM ให้อย่างเดียวและรวมกัน โดยมี glutamate + malate เป็นสับสเตรท ค่าในรูปแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การทดลองของเปอร์เซนต์การยับยั้งการใช้ออกซิเจนที่กระตุ้นโดยแคลเซียม ผลการทดลองพบว่าไมโตคอนเดรียที่ได้รับสังกะสีอย่างเดียวยับยั้งการใช้ออกซิเจนที่กระตุ้นโดยแคลเซียมได้มากขึ้นตามปริมาณสังกะสีที่ให้เพิ่มขึ้น แคดเมียมอย่างเดียวสามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนได้เช่นเดียวกัน เมื่อให้โลหะหนักรวมกันการยับยั้งการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสังกะสีที่เพิ่มขึ้น แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่สังกะสีความเข้มข้น 2-10 μM เมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียว แสดงด้วยเครื่องหมาย ▲ และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสังกะสีที่ให้อย่างเดียว

3.2 ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อฤทธิ์ของโลหะหนักในการยับยั้งอัตราการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียมเมื่อให้แคดเมียม 1 μM หรือสังกะสี 4 μM ที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน โดยมี glutamate + malate เป็นสับสเตรท

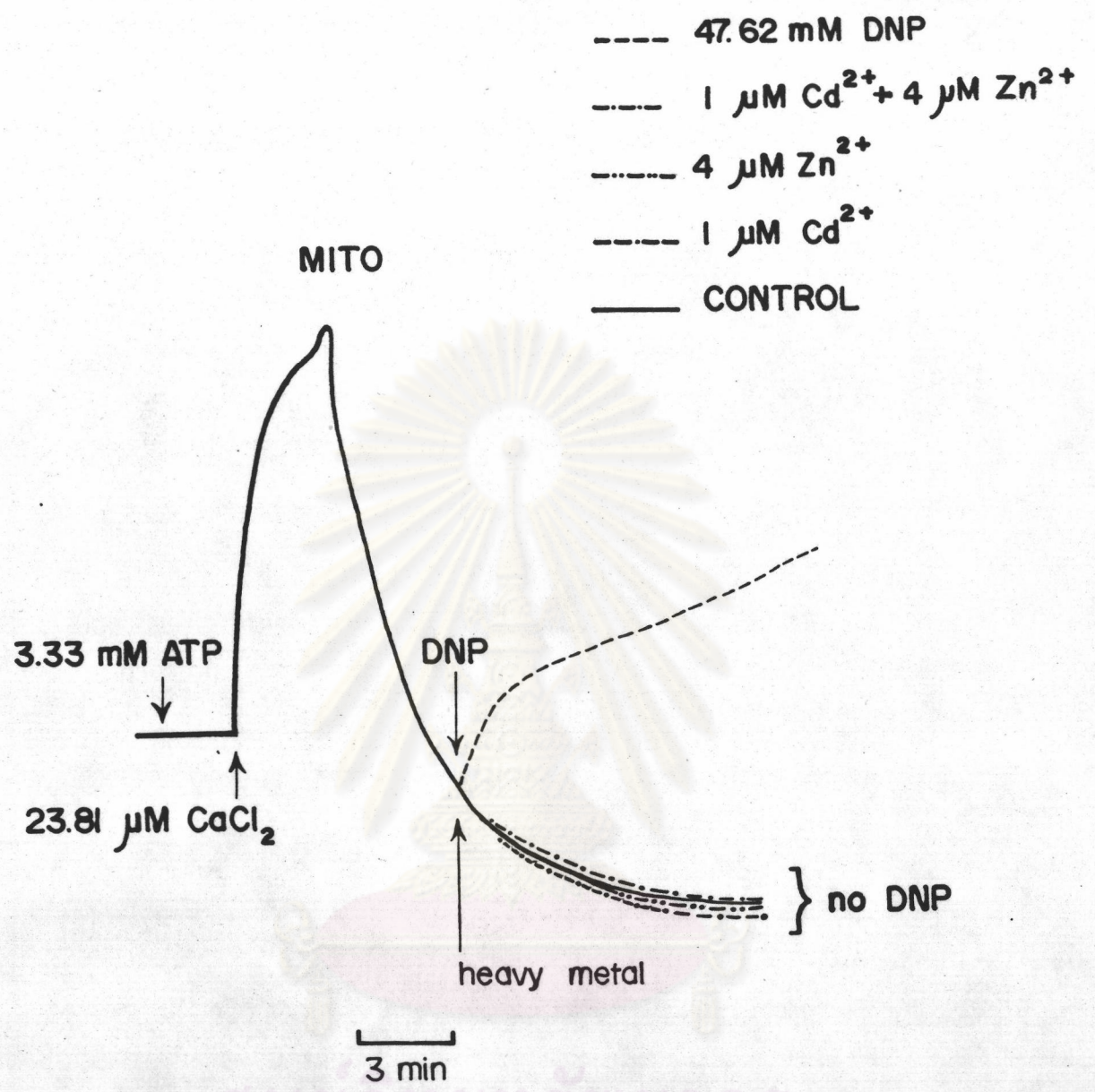
ทำการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 18 การให้ 0.98 mM DTT ก่อนหรือหลังได้รับโลหะหนักแล้วเปรียบเทียบระหว่างการได้รับ DTT และไม่ได้รับ DTT ผลของการทดลองแสดงในตารางที่ 9 ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจาก 4 การ



รูปที่ 21

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 34.29 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.71 mM $MgCl_2$, 78.85 mM KCl, 0.43 M potassium phosphate, 4.76 mM potassium glutamate + 4.76 mM potassium malate, 47.62 mM DNP, 23.81 μM $CaCl_2$ 23.81 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 4.65 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป ปริมาตรรวมทั้งหมด 2.1 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 22

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ ATP เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 34.29 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.71 mM $MgCl_2$, 78.85 mM KCl, 0.43 mM potassium phosphate, 3.33 mM ATP, 47.62 mM DNP, 23.81 μM $CaCl_2$, 23.81 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 4.05 มก.โปรตีน/มล. แคดเมียมและสังกะสีขนาดต่าง ๆ เติมลงในปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูป ปริมาตรรวมทั้งหมด 2.1 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

ทดลองของเปอร์เซนต์การยับยั้งอัตราการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียม เมื่อไม่มี DTT และเมื่อให้ DTT ก่อนหรือหลังได้รับโลหะหนัก จากผลการทดลองพบว่า 0.98 mM DTT ไม่สามารถป้องกัน และแก้ไขฤทธิ์ของแคดเมียมในการยับยั้งอัตราการหายใจที่ถูกกระตุ้นโดยแคลเซียมได้ เมื่อให้ DTT ทั้งก่อนและหลังให้สังกะสีอย่างเดียวหรือสังกะสีรวมกับแคดเมียมพบว่า DTT สามารถลดฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียมได้อย่างมีนัยสำคัญ แสดงด้วยเครื่องหมาย *

3.3 ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 21 เป็นตัวอย่าง tracing แสดงผลของแคดเมียม 1 μM หรือสังกะสี 4 μM ที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทในการทดลองนี้ใช้ Ca^{2+} -selective electrode ในการวัดการเปลี่ยนแปลงของ Ca^{2+} ใน medium เส้น tracing ที่เคลื่อนที่ขึ้นหรือเคลื่อนที่ลงแสดงว่าความเข้มข้นของ Ca^{2+} ใน medium เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า แคดเมียมความเข้มข้น 1 μM ที่ให้อย่างเดียวกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมได้เล็กน้อย กรณีใส่สังกะสีความเข้มข้น 4 μM การปลดปล่อยแคลเซียมได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแคดเมียมที่ให้อย่างเดียวและเมื่อให้โลหะหนักรวมกัน จะเสริมฤทธิ์ในการกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียม และเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบโดยใช้ 47.62 mM DNP พบว่า DNP กระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมได้เร็วกว่าโลหะหนักอย่างชัดเจน

รูปที่ 22 เป็นตัวอย่าง tracing แสดงผลของการทดลองทำนองเดียวกับรูปที่ 21 เพียงแต่ว่าเปลี่ยนไปใช้ ATP แทน glutamate + malate จากผลการทดลองพบว่า แคดเมียม 1 μM หรือสังกะสี 4 μM เมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกัน ไม่สามารถกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมได้เมื่อใช้ ATP เป็นสับสเตรท ส่วน DNP กระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมได้เช่นเดียวกับเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท แต่อัตราการปลดปล่อยช้ากว่า

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองในบทที่ 3 พบว่าโลหะหนัก แคดเมียมหรือสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันมีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว โดยมีผลยับยั้งการหายใจในสภาวะเกิดออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน หรือ state 3 respiration ของ coupled mitochondria (รูปที่ 14,15) ยับยั้งการหายใจในสภาวะที่ไม่มีฟอสฟอริลเลชัน แต่มีออกซิเดชันหรือ state 3 u respiration (รูปที่ 16, ตาราง 5) ไม่มีผลกระตุ้นแต่มีแนวโน้มที่จะยับยั้งเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย (รูปที่ 17, ตาราง 7, 8) ยับยั้งอัตราและปริมาณการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม (รูปที่ 18-20) และทำให้ไมโตคอนเดรียปลดปล่อยแคลเซียมเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท (รูปที่ 21) โดยทั่วไปพบว่าการให้โลหะหนัก แคดเมียมและสังกะสี รวมกันมีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการให้สังกะสีเพียงอย่างเดียว สิ่งที่จะอภิปรายต่อไปนี้กล่าวถึงแนวทางการออกฤทธิ์ของโลหะหนักทั้งสองที่ให้อย่างเดียวและรวมกันต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน และการขนส่งแคลเซียม ซึ่งเป็นหน้าที่ที่สำคัญมากสองประการของไมโตคอนเดรียที่แยกจากเนื้อเยื่อของสัตว์ชั้นสูงทั่วไป

1. ฤทธิ์ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน

ออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันเป็นกระบวนการที่เกิดจากการประกบหรือควบคู่กัน (couple) ของสองกระบวนการ คือ ออกซิเดชันและฟอสฟอริลเลชัน กระบวนการออกซิเดชันประกอบด้วย 3 กระบวนการที่สำคัญ คือ การขนส่งสับสเตรทจากภายนอกเข้าสู่ภายในไมโตคอนเดรีย การการออกซิไดซ์สับสเตรทโดยเอ็นไซม์ substrate dehydrogenase ต่าง ๆ และการขนส่ง reducing equivalent จาก NADH และ $FADH_2$ เป็นต้น เข้าลูกโซ่การหายใจส่วนกระบวนการฟอสฟอริลเลชัน ประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ การขนส่ง ADP และ Pi เข้าในไมโตคอนเดรียและการสร้าง ATP จาก ADP+Pi โดยอาศัยเอ็นไซม์ ATPsynthase (39-40) ดังนั้นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันนี้ ต้องมีฤทธิ์ยับยั้งที่กระบวน

การใดกระบวนการหนึ่งหรือยับยั้งทั้งสองกระบวนการก็ได้ ตัวอย่างของสารที่ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันที่รู้จักกันดีได้แก่สารในกลุ่ม inhibitor of respiratory chain อันได้แก่ rotenone, antimycin และ cyanide เป็นต้น สารในกลุ่ม inhibitor of ATPsynthase อันได้แก่ oligomycin เป็นต้น ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 1 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ NAD^+-linked substrate คือ glutamate + malate เป็นสับสเตรทแคดเมียมหรือสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน มีผลยับยั้ง state 3 respiraton ของไมโตคอนเดรีย (รูปที่ 14,15) ผลดังกล่าวแสดงว่าโลหะหนักมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันโดยอาจออกฤทธิ์ที่กระบวนการออกซิเดชัน และ/หรือฟอสฟอริลเลชัน เมื่อทำการศึกษาถึงผลต่อ state 3 u respiration โดยใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทเช่นกัน พบว่าโลหะหนักที่ให้อย่างเดียวหรือรวมกันมีผลยับยั้ง (รูปที่ 16) เนื่องจาก state 3 u respiration เป็นสภาวะที่เกิดการออกซิเดชันแต่เพียงอย่างเดียว จึงแสดงว่าโลหะหนักออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน เมื่อทำการทดลองโดยใช้สับสเตรทที่ส่งอิเลคตรอนเข้าลูกโซ่การหายใจที่ตำแหน่งต่างกัน (ตารางที่ 5) พบว่าโลหะหนักมีผลยับยั้ง state 3 u respiration เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรทน้อยมาก ซึ่งพบผลทำนองเดียวกันเมื่อใช้ osmotic-shocked mitochondria (ตารางที่ 6) เนื่องจาก ascorbate+TMPD ส่งอิเลคตรอนเข้าลูกโซ่การหายใจที่ cytochrome c ผลดังกล่าวทั้งหมดนี้ จึงแสดงว่า โลหะหนักมีผลน้อยมากต่อการทำงานของ cytochrome oxidase (complex IV) ซึ่งขนส่งอิเลคตรอนจาก cytochrome c ไปสู่ออกซิเจน นอกจากนั้นการที่โลหะหนักสามารถยับยั้งการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH (ซึ่งให้อิเลคตรอนได้โดยตรงกับลูกโซ่การหายใจ) เป็นสับสเตรท (ตารางที่ 6) แสดงว่าโลหะหนักยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันโดยยับยั้งที่ลูกโซ่การหายใจ และตำแหน่งที่โลหะหนักออกฤทธิ์อยู่ก่อน cytochrome c ซึ่งข้อสรุปดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิจัยของคณะวิจัยอื่น ๆ เช่น ได้มีผู้ศึกษาผลของแคดเมียมต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย พบว่า แคดเมียมความเข้มข้นน้อยกว่า 0.3 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมไมโตคอนเดรียโปรตีน (0.3 µM) กระตุ้น state 4 respiration ความเข้มข้น 10 นาโนโมลต่อมิลลิกรัม ไมโตคอนเดรียโปรตีน (10 µM) ยับยั้งการหายใจที่ cytochrome b ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ยับยั้งที่ flavin (41) Cameron และคณะ (42) รายงานว่าแคดเมียมความเข้มข้นต่ำ ๆ ประมาณ 3.3-4.0 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้ง state 3 respiration ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนู เมื่อใช้สับสเตรทชนิด NAD^+ linked ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ยับยั้ง state 3 respiration ได้ 89% เมื่อใช้ succinate

เป็นสับสเตรท Prasada และ Gardner (43) รายงานว่าแคดเมียม 850 ไมโครกรัมต่ออากาศลูกบาศก์เมตร ให้หนูสูดดมจะลดการทำงานของเอ็นไซม์ succinic dehydrogenase Toury และคณะ (44) รายงานว่าแคดเมียม 50 ppm ผสมในน้ำดื่มให้แก่หนูเพศผู้ มีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ succinic dehydrogenase แต่ไม่มีผลต่อ cytochrome oxidase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการขนส่งอิเลคตรอนจาก cytochrome c สู่ออกซิเจน ส่วนสังกะสี Yamaguchi (45) รายงานว่าสังกะสีความเข้มข้น 1-10 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจโดยมีผลที่ cytochrome b และ c_1 แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase

จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมาแสดงว่าโลหะหนักเมื่อให้อย่างเดียว หรือรวมกันมีผลยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันที่ลูกโซ่การหายใจในบริเวณก่อน cytochrome c เนื่องจากการยับยั้งออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน สามารถเกิดจากการยับยั้งออกซิเดชันและ/หรือฟอสฟอริลเลชัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า โลหะหนักอาจมีผลต่อกระบวนการฟอสฟอริลเลชันด้วย เอ็นไซม์ที่มีความสำคัญมากต่อกระบวนการฟอสฟอริลเลชัน คือ เอ็นไซม์ ATPsynthase ตามปกติใน coupled mitochondria เอ็นไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP + Pi แต่เมื่อไมโตคอนเดรียถูก uncouple เช่นการให้ DNP หรือการทำ osmotic shock เพื่อเพิ่ม permeability ของเมมเบรนชั้นในต่อ H^+ เอ็นไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการ hydrolysis ของ ATP ไปเป็น ADP + Pi หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ในสภาวะ uncouple เอ็นไซม์ ATPsynthase จะแสดงตัวออกมาในรูปของเอ็นไซม์ ATPase สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ATPsynthase เช่น oligomycin จะยับยั้ง ATPase ของไมโตคอนเดรียเช่นกัน (46) ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงผลของโลหะหนักที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมมา 2 แบบ แบบแรกเป็น intact mitochondria แล้วเติม DNP ลงไป เพื่อ uncouple ไมโตคอนเดรียแล้วส่งผลให้มีการกระตุ้น ATPase activity (ตารางที่ 7) การเติม uncoupler เป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจาก coupled mitochondria มี ATPase activity ต่ำ ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองในตารางที่ 7 ส่วนอีกแบบเป็น osmotic-shocked mitochondria (ตารางที่ 8) การทำ osmotic-shock เป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่ม permeability ของเมมเบรนชั้นในต่อ H^+ และสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กอื่น ๆ ดังนั้น osmotic-shocked mitochondria จึงเป็น uncoupled mitochondria และมี ATPase activity สูง โดยไม่ต้องเติม uncoupler นอกจากนั้นสารโมเลกุลเล็กเช่น ATP, ADP และ Pi ยังสามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนชั้นในของ osmotic-shocked mitochondria ได้โดยไม่จำเป็นต้องอาศัย tran-

sport system เช่น ในกรณีของ intact mitochondria จากตารางที่ 7 และ 8 จะเห็นว่าโลหะหนักมีแนวโน้มที่จะยับยั้ง ATPase activity ของไมโตคอนเดรียแต่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ไม่ว่า ATPase จะเกิดจากการกระตุ้นด้วย DNP หรือโดยการนำไมโตคอนเดรียไปทำ osmotic shock ซึ่งผลดังกล่าวนี้ชี้แนะว่า โลหะหนักมีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก ADP + Pi โดยเอ็นไซม์ ATPsynthase เพียงเล็กน้อยเช่นกัน การที่โลหะหนักมีผลต่อ ATPase activity คล้ายกันไม่ว่าจะใช้ intact หรือ osmotic-shocked mitochondria แสดงว่าโลหะหนักไม่ได้ยับยั้งการขนส่งของ ATP, ADP และ Pi ผ่านเมมเบรนชั้นใน ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของโลหะหนักเกิดจากฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนที่ลูกโซ่การหายใจเป็นสำคัญ

สำหรับปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการยับยั้ง state 3 respiration โดยโลหะหนักที่ได้ทำการศึกษาในการวิจัยนี้ได้แก่ DTT (เป็นสารป้องกัน -SH group) EDTA (เป็น chelating agent) และ Mg^{2+} (เป็น divalent cation เช่นเดียวกับโลหะหนักที่นำมาศึกษา) ในกรณีของ DTT (ตารางที่ 2) พบว่าสารนี้สามารถลดฤทธิ์ของโลหะหนักที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันได้ไม่ว่าจะให้ DTT ก่อนหรือหลังโลหะหนัก ผลดังกล่าวชี้แนะว่าโลหะหนักออกฤทธิ์โดยการจับกับ -SH group ของไมโตคอนเดรีย เนื่องจาก DTT ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของโลหะหนักได้อย่างสมบูรณ์ ถึงแม้จะให้ DTT ในความเข้มข้นที่สูงกว่าโลหะหนักเป็นอย่างมากจึงเป็นไปได้ว่าโลหะหนักทั้งสองอาจไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้ง state 3 respiration โดยจับกับ -SH group ของไมโตคอนเดรียเพียงกลไกเดียวเท่านั้น ส่วน EDTA (ตารางที่ 3) ให้ผลทำนองเดียวกับ DTT เนื่องจาก EDTA สามารถแตกตัวเป็นโมเลกุลที่มีประจุได้ที่ pH 7.2 จึงเป็นไปไม่ได้อย่างยิ่งที่ EDTA จะสามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนชั้นในของไมโตคอนเดรีย ดังนั้นการที่ EDTA สามารถลดฤทธิ์ของโลหะหนักได้แต่ไม่สมบูรณ์จึงน่าจะแปรผลได้ว่าบางส่วนของโลหะหนักออกฤทธิ์ที่บริเวณผิวด้านนอก (outer surface) ของเมมเบรนชั้นใน และมีบางส่วนออกฤทธิ์ที่บริเวณผิวด้านใน (inner surface) ของเมมเบรนชั้นในและ/หรือภายใน matrix ของไมโตคอนเดรีย อนึ่งเป็นที่น่าสังเกต ว่าการให้ DTT หรือ EDTA ก่อนโลหะหนักมีแนวโน้มที่จะลดฤทธิ์ของโลหะหนักได้ดีกว่าการให้หลังโลหะหนัก อาจเป็นไปได้ว่าการให้โลหะหนักกับไมโตคอนเดรียก่อน ทำให้โลหะหนักบางส่วนถูกขนส่งเข้าไปออกฤทธิ์ในไมโตคอนเดรีย (47) ส่วน DTT และ EDTA ไม่สามารถผ่านเมมเบรนชั้นใน ดังนั้นจึงไม่สามารถแก้ไขฤทธิ์ของโลหะหนักส่วนที่อยู่ภายในไมโตคอนเดรียได้ ในกรณีของ Mg^{2+} (ตารางที่ 4) พบว่า Mg^{2+} ที่ความเข้ม

ข้นสูงนอกจากจะไม่ลดฤทธิ์ของโลหะหนักแล้ว ยังทำให้โลหะหนักออกฤทธิ์ ได้เพิ่มขึ้นด้วย ขณะนี้ยังไม่ทราบถึงกลไกที่ Mg^{2+} ไปเพิ่มฤทธิ์ของโลหะหนัก แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลนี้แสดงว่า Mg^{2+} ไม่สามารถที่จะไล่ที่โลหะหนักออกจาก binding site ที่ไมโตคอนเดรียได้

2. ฤทธิ์ต่อกระบวนการขนส่งแคลเซียม

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าการขนส่งและสะสม Ca^{2+} โดยไมโตคอนเดรียเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยพลังงานจากการออกซิไดซ์สับสเตรท หรือ ATP hydrolysis (48) กลไกการขนส่ง Ca^{2+} โดยไมโตคอนเดรียที่ยอมรับกันในปัจจุบัน คือ Ca^{2+} จะจับกับ carrier molecule (calcium uniporter) ซึ่งอยู่ที่เมมเบรนชั้นใน จากนั้น Ca^{2+} จึงเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนชั้นในเข้าไปในไมโตคอนเดรียโดยอาศัยแรงดูดกันของประจุ + 2 ของ Ca^{2+} กับ negative potential ภายในไมโตคอนเดรีย (49) ซึ่งความต่างศักย์ของเมมเบรนชั้นใน (ด้าน matrix มีค่าเป็นลบเมื่อเทียบกับด้านนอก) นี่ก็คือส่วนหนึ่งของ protonmotive force ซึ่งเกิดมาจากการออกซิไดซ์สับสเตรท หรือ ATP hydrolysis นั่นเอง ใน medium ที่มีสับสเตรท แต่ไม่มี ATP การเติม Ca^{2+} (50) หรือ Ca^{2+} + Pi (51) ลงไปจะทำให้เกิดการกระตุ้นการหายใจเมื่อมีการขนส่ง Ca^{2+} เข้าไปในไมโตคอนเดรียและสารที่เป็น respiratory chain inhibitor สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการดังกล่าวได้ (48) จากผลการทดลองที่ได้อภิปรายมาข้างต้นได้แสดงว่าโลหะหนักทั้งสอง เมื่อให้อย่างเดียวหรือให้รวมกันออกฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor ดังนั้นโลหะหนักนี้จึงควรมีผลต่อการขนส่งและกระตุ้นการหายใจ Ca^{2+} เช่นกัน จากผลการทดลองนี้แสดงในรูปที่ 18, 19 และ 20 จะเห็นว่า โลหะหนัก มีผลสองประการต่อกระบวนการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+} กล่าวคือ 1) ลดอัตราการหายใจ ซึ่งแสดงว่าอัตราการขนส่ง Ca^{2+} เข้าไปในไมโตคอนเดรียลดลงและ 2) ลดปริมาณการใช้ออกซิเจน ซึ่งแสดงว่าปริมาณ Ca^{2+} ที่ถูกขนส่งเข้าไปในไมโตคอนเดรียลดลง นอกจากนั้น DTT ซึ่งลดฤทธิ์ของโลหะหนักต่อ state 3 respiration สามารถลดฤทธิ์ของโลหะหนักที่มีต่ออัตราการหายใจที่กระตุ้นโดย Ca^{2+} ได้เช่นกัน (ตารางที่ 9) ข้อมูลนี้สนับสนุน ว่าฤทธิ์ของโลหะหนักที่มีต่อกระบวนการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+} เป็นผลสืบเนื่องมาจากฤทธิ์ของโลหะหนักในการยับยั้งที่ลูกโซ่การหายใจ

การศึกษาฤทธิ์ของโลหะหนักต่อการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+} ให้ข้อมูลเฉพาะการขนส่ง Ca^{2+} เข้าไปสะสมในไมโตคอนเดรียเท่านั้น ไม่สามารถบอกได้ว่าไมโตคอนเดรียมีการปลดปล่อย Ca^{2+} ออกมาหรือไม่ การศึกษาเรื่องการปลดปล่อยCa^{2+}ของไมโตคอนเดรียจำเป็นจะต้องใช้การวัดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Ca^{2+}ใน medium ซึ่งกระทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่นิยมกัน คือ การใช้ Ca^{2+} selective electrode ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึง ผลของโลหะหนักที่มีต่อการปลดปล่อย Ca^{2+} โดยใช้ Ca^{2+} selective electrode จากรูปที่ 21 จะเห็นว่าใน medium ที่มี glutamate + malate เป็นสับสเตรทและมี Pi รวมอยู่ด้วย แต่ไม่มี ATP โลหะหนัก มีแนวโน้มที่จะกระตุ้นการปลดปล่อย Ca^{2+} ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับฤทธิ์ของโลหะหนักในการยับยั้งลูกโซ่การหายใจ (48) เมื่อทำการทดลองโดยใช้ ATP เป็นสับสเตรทแทน glutamate + malate พบว่าโลหะหนักไม่สามารถกระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียปลดปล่อย Ca^{2+} ได้ (รูปที่ 21) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการที่โลหะมีผลยับยั้งน้อยมากต่อ ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 7, 8) เมื่อเปรียบเทียบกับ DNP (ซึ่งมีฤทธิ์เป็น uncoupler ทำให้ protonmotive force สลายไป) จะพบว่าโลหะหนักกระตุ้นการปลดปล่อย Ca^{2+} ด้วยอัตราที่ช้ากว่า DNP มาก (รูปที่ 21) ทั้งนี้คงเป็นเพราะว่าความเข้มข้นของโลหะหนักที่ใช้ไม่สามารถยับยั้งลูกโซ่การหายใจได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 15, 16)

วัตถุประสงค์อย่างหนึ่งของการวิจัยนี้คือ การศึกษาว่าการได้รับโลหะหนัก แคดเมียมและสังกะสีรวมกันจะมีผลอย่างไรต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับการได้รับโลหะหนักชนิดเดียว เมื่อพิจารณาถึงผลของโลหะหนักที่มีต่อหน้าที่สำคัญสองประการของไมโตคอนเดรีย คือ ออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน (รูปที่ 15) และการขนส่งแคลเซี่ยม (รูปที่ 19, 20) พบว่า ถึงแม้การให้แคดเมียมรวมกับสังกะสีมีแนวโน้มที่จะยับยั้งกระบวนการทั้งสองมากกว่าการให้สังกะสีแต่เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้วไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของสังกะสีในช่วง 4-10 μM เป็นไปได้ว่าสังกะสีในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวสามารถไล่ที่แคดเมียมออกจาก binding site ที่ไมโตคอนเดรียได้ เนื่องจาก ทั้งแคดเมียมและสังกะสีต่างเป็น divalent cation ที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีคล้ายกัน (52) Jacobs และ Jacobs (53) ได้แสดงว่า divalent cation ตัวอื่น เช่น Mn^{2+}, Co^{2+} และ Ni^{2+} สามารถแก้ไขฤทธิ์ของแคดเมียมต่อการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรียที่แยกจากไต และตับหนูได้เมื่อใช้แคดเมียมความ

เข้มข้นต่ำ เนื่องจากในการวิจัยนี้ใช้แคดเมียมที่ความเข้มข้นเดียว คือ 1 μM ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสังกะสีสามารถลด หรือต้านฤทธิ์ของแคดเมียมต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้แคดเมียมความเข้มข้นสูงกว่า 1 μM ได้หรือไม่ ประเด็นนี้จะต้องมีการทำวิจัยต่อไป

ตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 1 การให้สังกะสีแก่สัตว์ทดลองที่ได้รับแคดเมียม สามารถลดพิษของแคดเมียมลงได้ ซึ่งกลไกที่เชื่อกันก็คือ สังกะสีไปกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน metallothionein ซึ่งสามารถจับกับแคดเมียมได้แต่กลไกดังกล่าวอาจไม่ใช้กลไกเดียวที่สังกะสีลดฤทธิ์ของแคดเมียม Wicklund และคณะ (54) เชื่อว่าสังกะสีมีฤทธิ์รบกวนการ uptake ของแคดเมียมเข้าสู่เนื้อเยื่อหรือผนังของ organelle และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มการขับถ่ายของแคดเมียมที่เหงือกปลา นอกจากนี้ได้มีผู้ศึกษาโดยนำลำไส้หนูขาวที่แยกออกมาศึกษา พบว่าแคดเมียมถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ที่ duodenum, jejunum และ ileum การดูดซึมจะรวดเร็วในระยะแรก ส่วนสังกะสีถูกดูดซึมที่ชั้น mucosa ของลำไส้เช่นกัน mucosa ของลำไส้เช่นกัน และพบว่าสังกะสีความเข้มข้น 10^{-5}-10^{-3}M เสริมฤทธิ์ให้แคดเมียมถูกดูดซึมเพิ่มขึ้นแต่ถ้าให้สังกะสีความเข้มข้นสูงๆ การดูดซึมแคดเมียมจะลดลง ซึ่งแสดงว่ามีการแข่งขันกัน ในการนำโลหะเข้าสู่ผนังลำไส้ ได้มีการศึกษาถึง interaction ระหว่างแคดเมียมและสังกะสีในหนู mice และหนูขาว พบว่า แคดเมียม 100 ppm ลดการเพิ่มน้ำหนักหนูและสามารถแก้ไขมลพิษโดยใช้สังกะสี ซึ่งกลไกการ interaction ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่ามีการแข่งขันกันจับกับ protein binding site ที่ mucosa cell และในเนื้อเยื่ออื่น ๆ (55) Nriagu (56) สนับสนุนว่าโลหะหนักทั้ง 2 ตัวต่างมีคุณสมบัติ anatagonise กันในการทำให้เกิดการตอบสนองทาง biology ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องจากมีการแข่งขันในการจับกับ carrier protein หลายชนิด แต่การให้แคดเมียมหรือการให้สังกะสีไม่จำเป็นที่จะมีผลไปลดความเข้มข้นของสารอีกตัวหนึ่งเสมอไป Lease (55) ได้ทำการทดลองการดูดซึมของสังกะสีในไก่ที่ให้ทานแคดเมียม ใน 24 ชั่วโมงแรกระดับสังกะสีในเลือดและที่กระดูก tibia ลดลง แต่ที่ตับไม่ลดลงซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าการดูดซึมแคดเมียม หรือสังกะสีจะมากหรือน้อยขึ้นกับจำนวนและสัดส่วนของโลหะแต่ละตัวรวมทั้งระยะเวลาในการให้โลหะแต่ละชนิด เนื่องจากการที่แคดเมียมและสังกะสีมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่คล้ายกัน และสามารถแย่งที่กันเมื่อจับกับโปรตีนหรือเอ็นไซม์ต่าง ๆ นี้เองจึงทำให้แคดเมียมไปก่อผลพิษต่อร่างกายได้ โดยไปไล่ที่สังกะสีที่จับกับเอ็นไซม์ต่าง ๆ แทน ส่งผลให้เกิดอาการพิษซึ่งคล้ายกับสภาวะการขาดสังกะสี นอกจากนั้นผลของงานวิจัยนี้ยังชี้แนะว่าสังกะสีสามารถลดฤทธิ์ของแคดเมียมต่อไมโตคอนเดรียได้ โดยกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสัง-

เคราะห์ metallothionein เพราะเป็นการทดลองแบบ in vitro กับไมโตคอนเดรียที่ได้แยกออกมาจากเซลตับแล้ว ผลเหล่านี้ชี้แนะว่าสังกะสีอาจต้านฤทธิ์ของแคดเมียมได้ด้วยกลไกหลายอย่าง

กล่าวโดยสรุปผลการวิจัยนี้แสดงว่าโลหะหนัก แคดเมียมและสังกะสี เมื่อให้อย่างเดียวหรือรวมกันมีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดยยับยั้งการหายใจใน state 3 และการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซียม ฤทธิ์ดังกล่าวเกิดจากการที่โลหะหนักไปยับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนของลูกโซ่การหายใจที่บริเวณก่อน cytochrome c เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า การให้แคดเมียมรวมกับสังกะสีมีผลต่อไมโตคอนเดรียซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการให้สังกะสีแต่เพียงอย่างเดียว ผลดังกล่าวชี้แนะว่าสังกะสีมีความสามารถที่จะต้านฤทธิ์ของแคดเมียมที่มีต่อไมโตคอนเดรียได้ ซึ่งกลไกยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ metallothionein

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย