ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการทำงาน

ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

นางสาว วิภาวดี โสมเกษตรินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-110-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018240

EFFECTS OF CADMIUM AND ZINC ON THE FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA

Miss Vipawadee Somakstarin

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-110-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย ที่แยกจากตับหนูขาว
โดย	นางสาว วิภาวดี โสมเกษตรินทร์
ภาควิชา	สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ อุษณา หงส์วารีวัธน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกร จุฑะพงษ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑล สงวนเสริมศรี)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

วิภาวดี โสมเกษตรินทร์ : ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว (EFFECTS OF CADMIUM AND ZINC ON THE FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA) อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร. ประกร จูฑะพงษ์, 90 หน้า. ISBN 974-581 110-6

แคดเมียม (1 μM) และสังกะสี (1-10 μM) เมื่อให้อย่างเดียวหรือรวมกันมีผลยับยั้งการหายใจใน state 3 และการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซียมของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับของหนูขาว โดยมี glutamate + malate เป็นสับสเตรท DTT หรือ EDTA สามารถลดฤทธิ์ดังกล่าวของโลหะหนักได้ แคดเมียมและสังกะสีมีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH และ succinate เป็นสับสเตรท แต่ผลมีเพียงเล็กน้อยเมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท โลหะหนักทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้ง ATPase activity ที่กระตุ้นโดย DNP ของไมโตคอนเดรียเพียงเล็กน้อย ผลดังกล่าวแสดงว่าแคดเมียมและสังกะสียับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียโดยยับยั้งลูกโซ่การหายใจที่บริเวณก่อน cytochrome c จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการให้แคดเมียมรวมกับสังกะสี มีผลยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียที่ไม่แตกต่างไปจากการให้สังกะสีอย่างเดียว ผลดังกล่าวชี้แนะว่าสังกะสีต้านฤทธิ์ของแคดเมียมต่อไมโตคอนเดรีย กลไกที่สังกะสีลดฤทธิ์ของแคดเมียมยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ไม่ควรจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ metallothionein

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

C245433 : MAJOR PHARMACOLOGY
KEY WORD : CADMIUM/ZINC/RAT LIVER/MITOCHONDRIA
VIPAWADEE SOMAKATARIN : EFFECTS OF CADMIUM AND ZINC ON THE FUNCTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. PRAKORN CHUDAPONGSE, Ph.D. 90 PP. ISBN 974-581-110-6

Cadmium (1 μM) and zinc (1-10 μM), alone or combined were found to depress state 3 and calcium-stimulated respiration of isolated rat liver mitochondria respiring with glutamate + malate as substrates. DTT or EDTA alleviated this inhibition. NADH and succinate oxidation by osmotic-shocked mitochondria were diminished by the heavy metals whereas oxidation of ascorbate + TMPD was slightly affected. Cadmium and zinc had little inhibitory effect on the DNP-activated mitochondrial ATPase activity. These results indicated that the heavy metals depressed mitochondrial functions by inhibiting the respiratory chain in the region ahead of cytochrome c. Statistical analysis showed no difference between the inhibition mediated by cadmium + zinc and zinc alone which suggested antagonistic action of zinc on cadmium. The mechanism of this antagonism is unclear at present but the participation of metallothionein biosynthesis appears very unlikely.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกร จุฑะพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาตลอดและเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้ บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ อุษณา หงส์วารีวัธน์ หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา และผู้ช่วยศาสตราจารย์สมชาย เมฆอรุณเรือง หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการตลอดการวิจัย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงิน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา รวมถึงบุคคลอื่น ๆ ที่ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

วิภาวดี โสมเกษตรินทร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญ ..... ฐ

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ 1

แคดเมียม 2

สังกะสี 8

การหายใจและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ของไมโตคอนเดรีย..... 14

2. อุปกรณ์และวิธีการ..... 25

การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว..... 25

1. สัตว์ทดลอง 25

2. วิธีการเตรียมไมโตคอนเดรีย 25

การ incubate ไมโตคอนเดรียและ incubation medium..... 29

1. การวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย..... 29

2. การวัดการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย 30

3. การวัดการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย..... 30

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะต่าง ๆ	31
	การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราการใช้.....	31
	ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ	34
	การวัดการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย.....	36
	การวัดการขนส่งแคลเซียมโดยไมโตคอนเดรีย.....	36
	การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย.....	37
	1. ขั้นตอนดำเนินการทดลองหาปริมาณของ ไมโตคอนเดรีย	37
	2. การเตรียมสารละลายที่ใช้.....	38
	การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัยและ แหล่งที่มาของสารเคมี	38
	1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง.....	38
	2. ความเข้มข้นและขนาดของสารเคมีที่ใช้บ่อย.....	38
	3. แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	39
	วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	40
3.	ผลการวิจัย.....	41
	ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อกระบวนการ ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน	41
	1. ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและเมื่อให้ รวมกันต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของ ไมโตคอนเดรีย และค่า RCI	41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2. ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อ state 3 respirtaion ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียม และสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน 48

3. ผลของ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ต่อ state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกัน... 50

4. อิทธิพลของ Mg^{2+} ที่มีต่อค่า RCI และ state 3 respiration..... 50

5. ผลต่อ state 3 u respiration..... 54

6. ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria 56

ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ในไมโตคอนเดรีย..... 60

1. ผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP และไม่กระตุ้นด้วย DNP..... 60

2. ผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase เมื่อใช้ osmotic -shocked mitochondria..... 60

ผลต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม

1. ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียมเมื่อใช้ glutamate + malalte เป็นสับสเตรท..... 62

2. ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อฤทธิ์ของโลหะหนักในการยับยั้งอัตราการหายใจที่กระตุ้นโดยแคลเซียม..... 70

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3. ผลของแคดเมียมและสังกะสีต่อการปลดปล่อยแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย	73
	4. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	74
	1. ฤทธิ์ต่อกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน.....	74
	2. ฤทธิ์ต่อกระบวนการขนส่งแคลเซียม.....	78
เอกสารอ้างอิง.....		82
ประวัติผู้เขียน.....		90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกัน ต่อค่า RCI และอัตราการหายใจใน state 3 และ state 4 ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท 45

2 ผลของ dithiothreitol (DTT) ต่อ state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียว และให้รวมกัน เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท..... 47

3 ผลของ ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) ต่อ state 3 respiration ที่ถูกยับยั้งโดยแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียว และให้รวมกัน เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท 49

4 ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อค่า RCI และ state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเปรียบเทียบระหว่าง medium ที่มี high Mg^{2+} และ no Mg^{2+} เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท 51

5 ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อ state 3 u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate, succinate และ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท 53

6 ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการหายใจของ osmotic-shoked mitochondria เมื่อใช้ NADH, succinate และ ascorbate + TMPD เป็นสับสเตรท 55

7 ผลของแคดเมียม และสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้น และไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP 59

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงการดูดซึมธาตุสังกะสีที่ควบคุมโดย homeostasis ของร่างกาย.....	11
2	แสดง model การทำงานของโปรตีน metallothionein	11
3	แสดงโครงสร้างของไมโตคอนเดรีย	16
4	แสดงเอ็นไซม์ โปรตีน และสารประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในไมโตคอนเดรีย ...	16
5	แสดงโครงสร้างของ F_1F_0 - ATPase	18
6	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงในเมมเบรนของไมโตคอนเดรียขณะเกิด protonmotive force	20
7	แสดงการนำ proton gradient ของไมโตคอนเดรียไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ	20
8	แสดงตำแหน่งที่สับสเตรทชนิดต่าง ๆ ส่งอิเลคตรอนเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจ	21
9	แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน	23
10	แสดงแผนภูมิขั้นตอนการปั่นแยกไมโตคอนเดรีย	27
11	แสดงส่วนประกอบของ Gilson reaction chamber	32
12	แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI	33
13	แสดงตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง	34
14	ตัวอย่าง tracing แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อ state 3 respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	43
15	แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อ state 3 respiration ของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ Glutamate + malate เป็นสับสเตรท	44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียวและให้รวมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อ state 3 u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ gluatmate + malate เป็นสับสเตรท	52
17	ตัวอย่าง tracing แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกันต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ในไมโตคอนเดรีย ที่กระตุ้นด้วย DNP	58
18	ตัวอย่าง tracing แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกันต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	64
19	ผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกันต่อการหายใจ ของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้น โดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	66
20	ผลของแคดเมียมและสังกะสีที่ให้อย่างเดียวและให้รวมกันต่อปริมาณการใช้ ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่กระตุ้นโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท	68
21	ตัวอย่าง tracings แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสีเมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกันต่อการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate+ malate เป็นสับสเตรท	71
22	ตัวอย่าง tracings แสดงผลของแคดเมียมและสังกะสี เมื่อให้อย่างเดียว และให้รวมกันต่อการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ ATP เป็น สับสเตรท	72

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

ดล.	=	เดซิลิตร
นน.	=	น้ำหนัก
มก.	=	มิลลิกรัม
มคก.	=	ไมโครกรัม
มคล.	=	ไมโครลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.โปรตีน/มล.	=	มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร
aa_3	=	cytochrome oxidase
Ag	=	Argentum (silver)
Au	=	Aurum (Gold)
ADP	=	adenosine-5-diphosphate
ATP	=	adenosine-3, 5-triphosphate
ATPase	=	adenosine triphosphatase
BAL	=	British Anti Lewisite
Bi	=	Bismuth
Ca^{2+}	=	calcium ion
Cd	=	cadmium
CCCP	=	carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone
Co	=	Cobalt
COMT	=	Catechol-o-metyltransferase
Cu	=	Copper
$CuSO_4$	=	Copper sulfate
$^{\circ}C$	=	degree celsius
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTPA	=	diethylenetriamine-pentaacetic acid
DTNB	=	5, 5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid

FAD	=	flavin adenine dinucleotide
$FADH_2$	=	reduced form of flavin adenine dinucleotide
FP	=	flavoprotein
FSH	=	follicle - stimulating hormone
glu	=	glutamate
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
Hg	=	Hydrargyrum (Mercury)
5-HT	=	5-hydroxytryptophan
IP	=	Intraperitoneal
KCl	=	Potassium chloride
KH_2PO_4	=	Potassium phosphate
LH	=	Luteinizing hormone
M	=	Molar
Mal	=	Malate
MAO	=	Monoamine oxidase
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
min	=	minute
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
µM	=	Micromolar
mOsM	=	milliosmole
MT	=	metallothionein
N	=	normality
$NaCO_3$	=	sodium carbonate
NaOH	=	sodium hydroxide
NAD^+	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduce form of nicotinamide adenine dinucleotide
natom O/ml	=	nanoatom oxygen/milliliter

natom O/mg protein/min	=	nanoatom oxygen/milligram protein/minute
Ni	=	Nickel
ppm	=	part per million
Pi	=	inorganic phosphate
RCI	=	Respiratory Control Index
rRNA	=	ribosomal RNA
RPM	=	revolution per minute
-SH group	=	Sulfhydryl
TMPD	=	N,N,N',N' - Tetramethyl - p - phenylenediamine
vit E	=	vitamin E
Zn	=	Zinc
$Zn(CN)_4^{2-}$	=	Tetra cyanozincate (II) ion
$Zn(NH_3)_4^{2+}$	=	Tetra amminezincate (II) ion
$ZnSO_4$	=	Zinc sulfate
%	=	percent
$\Delta \bar{\mu}H^+$	=	proton electrochemical gradient

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย