

อิทธิพลของโลหะหนักบางชนิด ที่มีต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย
ที่แยกจากตับของหนูขาว



นางสาว ศรีอโคก กังวาลไกล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท สาขาเภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2533


ISBN 974-578-293-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016981

i 10310095

THE INFLUENCE OF SOME HEAVY METALS ON
THE FUNCTION OF ISOLATED MITOCHONDRIA
FROM RAT LIVER



Miss Sriasoke Kungwanklai

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-578-293-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ อธิทินผลของโลหะหนักบางชนิดที่มีต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย
ที่แยกจากตับหนูขาว

โดย นางสาว ศรือโคก กังวาลไกล

ภาควิชา เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุกะพงษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

[Signature]
.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชรารักษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

[Signature]
.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อุณา หงส์วาริวัธน์)

[Signature]
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุกะพงษ์)

[Signature]
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี)

[Signature]
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร)



ศรีอโศก กังวาลไกล : อิทธิพลของโลหะหนักบางชนิดที่มีต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย
 ที่แยกจากตับของหนูขาว (THE INFLUENCE OF SOME HEAVY METALS ON THE
 FUNCTION OF ISOLATED MITOCHONDRIA FROM RAT LIVER) อ. ที่ปรึกษา :
 รศ.ดร. ประภร จุฑะพงษ์, ผศ. วิทยา จันทสูตร, 86 หน้า. ISBN 974-578-293-9

ตะกั่วในระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เมื่อให้ร่วมกับปรอทหรือแคดเมียม ในระดับ
 ความเข้มข้น 1-10 ไมโครโมลาร์ แบบ in vitro กับไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับของหนูขาว จะมี
 ผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียมากกว่าการได้รับโลหะหนักชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียวอย่างมี
 นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยจะมีผลยับยั้ง state 3 และ state 3U respiration
 ยับยั้งกระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยแคลเซียมและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์
 ATPase และผลที่เพิ่มขึ้นเป็นไปในทาง additive effect ยกเว้นกรณีของเอนไซม์โมโนเอมีน
 ออกซิเดส ซึ่งปรอทและแคดเมียมไปลดฤทธิ์ของตะกั่วในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ ข้อมูลจาก
 การวิจัยนี้ควรจะชี้เป็นแนวทางได้ว่าการได้รับโลหะหนักมากกว่าหนึ่งชนิดในเวลาเดียวกัน อาจก่อให้เกิด
 ผลเสียต่อการทำงานของเซลล์มากกว่าการได้รับโลหะหนักเพียงชนิดเดียว



ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เกสซ์วิทยา
 สาขาวิชา เกสซ์วิทยา
 ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิต ศรีอโศก กังวาลไกล
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *[Signature]*
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *[Signature]*



SRIASOKE KUNGWANKLAI : THE INFLUENCE OF SOME HEAVY METALS ON THE
FUNCTION OF ISOLATED MITOCHONDRIA FROM RAT LIVER. THESIS ADVISOR :
ASSO. PROF. PRAKORN CHUDAPONGSE, Ph.D., ASSIS. PROF. WITHAYA
JANTHASOOT. 86 PP. ISBN 974-578-293-9

Lead, at concentration of 5 μM , added in vitro in combination with 1-10 μM cadmium or mercury affected the functions of mitochondria isolated from rat liver. Additions of these heavy metal combinations significantly altered mitochondrial functions more than individual metal ion ($P < 0.05$). Of the four mitochondrial activities studied state 3, state 3U and calcium-stimulated respiration were inhibited while ATPase activity was activated. The effects of heavy metal combinations are additive except monoamine oxidase activity in which cadmium as well as mercury antagonized the inhibitory effect of lead on this enzyme. These findings suggest that simultaneous of two different heavy metals would be more deleterious to cell functions than exposure to single agent.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชวิทยา
สาขาวิชา เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต นศ.อรรษา กิ่งชาติทอง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Prakorn Chudapongse
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Withaya Janthasoot



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จจุล่งไปได้อย่างดีเยี่ยมของ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านทั้งสองได้ให้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยครั้งนี้ด้วยดีมาตลอด และเนื่องจาก ทุนวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ เกษักรหญิง สุภา เลาหะจินดา หัวหน้าฝ่าย เกษักรกรม 7 โรงพยาบาลสมุทรปราการ ที่ได้ให้ความสนับสนุนในการลาศึกษาต่อใน ระดับปริญญาโทบัณฑิต ตลอดจนกรุณาเป็นผู้ค้ำประกันในหนังสือสัญญาการลาไปศึกษาต่อ ในครั้งนี้ด้วย

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งได้ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย เสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ศรีอโศก กังวาลไกล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

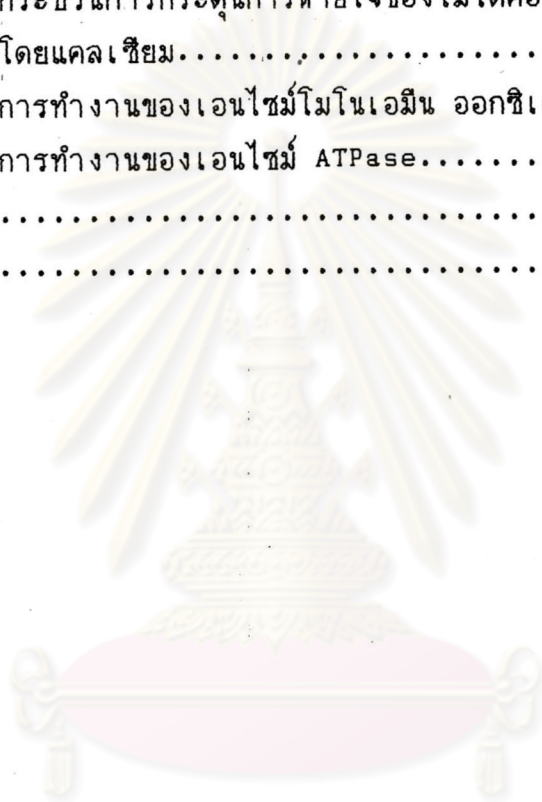


สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย.....	24
1 สัตว์ทดลอง.....	24
2 การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับของหนูขาว...	24
3 การ incubate ไมโทคอนเดรีย และ incubation medium.....	27
4 การวัดอัตราการหายใจออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย	28
5 การวัด ATPase activity.....	30
6 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง และ แหล่งที่มาของสารเคมี.....	30
7 การแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล ทางสถิติ.....	32
3 ผลการวิจัย.....	33
1 ผลของโลหะหนักที่นำมาศึกษาต่อกระบวนการ ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน.....	33
2 ผลของโลหะหนักที่นำมาศึกษาต่อกระบวนการกระตุ้น การหายใจของไมโทคอนเดรียโดยแคลเซียม...	57
3 ผลของโลหะหนักที่นำมาศึกษาต่อการทำงานของ เอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส ของไมโทคอนเดรีย	59
4 ผลของโลหะหนักที่นำมาศึกษาต่อการทำงานของ เอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย.....	62

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	65
1	กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน.....	65
2	กระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยแคลเซียม.....	68
3	การทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส..	69
4	การทำงานของเอนไซม์ ATPase.....	70
	เอกสารอ้างอิง.....	72
	ประวัติผู้เขียน.....	86



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของระดับตะกั่วในเลือดขนาดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในประชากรต่างอายุกัน.....	8
2	ผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกันต่อฤทธิ์ของ clorgyryne ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	48
3	ผลของตะกั่วและปรอทเมื่อให้อย่างเดี่ยว และเมื่อให้ร่วมกันต่อฤทธิ์ของ clorgyryne ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	49
4	ผลของ dithiotheritol (DTT) ต่อการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อถูกยับยั้งการทำงานโดยตะกั่วและแคดเมียม ทั้งเมื่อให้อย่างเดี่ยว และเมื่อให้ร่วมกัน เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	50
5	ผลของ dithiotheritol (DTT) ต่อการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อถูกยับยั้งการทำงานโดยตะกั่วและปรอท เมื่อให้อย่างเดี่ยว และเมื่อให้ร่วมกันเมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	51
6	ผลของแคดเมียมและปรอทเมื่อให้อย่างเดี่ยว และเมื่อให้ร่วมกับตะกั่วที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นโดย CCCP.....	53
7	ผลของแคดเมียมและปรอทเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกับตะกั่วที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย.....	55



สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

1	แสดงจุดที่ตะกั่วไปยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรีย.....	6
2	แสดงระดับ delta-aminolevulinic acid และ intermediats อื่น ๆ ที่เพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะ เมื่อได้รับตะกั่วแบบเรื้อรัง.....	7
3	แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate โดย differential centrifugation.....	25
4	แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการหาค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย.....	26
5	แสดงผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดียว และเมื่อให้ร่วมกันที่มีต่อกระบวนการ ออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	34
6	กราฟแสดงผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดียว และเมื่อให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	35
7	กราฟแสดงผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดียว และเมื่อให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชัน ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นสับสเตรท.....	36
8	แสดงผลของตะกั่วและปรอทเมื่อให้อย่างเดียว และเมื่อให้ร่วมกันที่มีต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	37
9	กราฟแสดงผลของตะกั่วและปรอท เมื่อให้อย่างเดียว และเมื่อให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท.....	38

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
10	กราฟแสดงผลของตะกั่วและปรอทเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริลเลชันของไมโตคอนเดรีย เมื่อให้ succinate เป็นสับสเตรท.....	39
11	ผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกันที่มีต่อกระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียม.....	40
12	กราฟแสดงผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งกระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียม.....	41
13	ผลของตะกั่วและปรอทเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกันที่มีต่อกระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียม.....	42
14	กราฟแสดงผลของตะกั่วและปรอทเมื่อให้อย่างเดี่ยวและให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งกระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียม...	43
15	ผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกันที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อให้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	44
16	กราฟแสดงผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดี่ยวและให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อให้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	45
17	ผลของตะกั่วและปรอทเมื่อให้อย่างเดี่ยวและเมื่อให้ร่วมกันที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อให้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
18	กราฟแสดงผลของตะกั่วและปรอทเมื่อให้อย่างเดียวและเมื่อให้ร่วมกันในขนาดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท.....	47
19	ตัวอย่าง tracing แสดงผลของตะกั่วและแคดเมียมเมื่อให้อย่างเดียว และเมื่อให้ร่วมกันที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย CCCP.....	52
20	ตัวอย่าง tracing แสดงผลของแคดเมียมและปรอทเมื่อให้อย่างเดียวและให้ร่วมกับตะกั่วที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย.....	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
ดล.	=	เดซิลิตร
นน.	=	น้ำหนัก
นนม.	=	นาโนโมล
มก.	=	มิลลิกรัม
มคก.	=	ไมโครกรัม
มคม.	=	ไมโครโมล
มคล.	=	ไมโครลิตร
มคอ.	=	ไมโครอะตอม
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
ADP	=	adenosine-5'-diphosphate
ALA	=	delta aminolevulinic acid
ALA-D	=	delta aminolevulinic acid dehydratase
ALA-U	=	delta aminolevulinic acid in urine
ATP	=	adenosine-3'-5'-triphosphate
° C	=	degree celcius
CaNa ₂ -EDTA	=	calcium disodium ethylene diamine tetraacetic acid
CCCP	=	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
Cd ²⁺	=	cadmium ion
Clor	=	clorgyryne
CP	=	coproporphyrin
CP-U	=	coproporphyrin in urine
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DPTA	=	Diethylenetriamine-pentaacetic acid
DTT	=	dithiotheritol
ECF	=	Extracellular fluid
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid

FEP	=	Free erythrocyte protoporphyrin
g	=	centrifugal force unit (gravity)
H ⁺	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
Hg ²⁺	=	mercuric ion
ICF	=	intracellular fluid
K ⁺	=	potassium ion
M	=	molar
mM	=	millimolar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
μ atom	=	microatom
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
N	=	normality
natom	=	nanoatom
nm	=	nanometer
O	=	oxygen
oligo	=	oligomycin
Pb ²⁺	=	lead ion
Pi	=	inorganic phosphate
RCI	=	respiratory control index
RPM	=	revolution per minute
tyr	=	tyramine
/	=	per
%	=	percent