บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองถึงโลหะหนักที่นำมาใช้ในการศึกษาโดยให้ชนิดเดียว และให้ร่วมกันต่อหน้าที่ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรีย พบว่าโลหะหนักที่ใช้ในการศึกษาทุกตัวมีผลต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียทั้งสิ้น และเมื่อให้ในลักษณะร่วมกันพบว่ามีทั้งการเพิ่มฤทธิ์กัน และไม่เพิ่มฤทธิ์กันในแต่ละกระบวนการที่ทำการวิจัย ซึ่งเป้าหมายหลักของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของการให้โลหะหนักร่วมกันต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียมากกว่าที่จะศึกษาถึงกลไกในการทำให้เกิดผลต่าง ๆ ต่อไมโตคอนเดรียในส่วนของบทนี้จะอภิปรายและสรุปผลการวิจัยเป็นหัวข้อดังต่อไปนี้

1. กระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น

มีการศึกษาถึงผลของแคดเมี่ยมต่อหน้าที่ของไมโตคอนเดรียพบว่าสามารถทำให้หน้าที่ของไมโตคอนเดรียถูกเปลี่ยนแปลง จากการศึกษา in vitroพบว่าแคดเมี่ยมในความเข้มข้นขนาด 0.01 µM จะจับกับเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย(7) และการจับจะจับแบบแข็งแรง ไม่สามารถล้างออกด้วยสารละลายซูโครสหลาย ๆ ครั้ง (52) ผลของแคดเมี่ยมต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น พบว่าในความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 นาโนโมล/มก.โปรตีนของไมโตคอนเดรีย แคดเมี่ยมกระตุ้น state 4 respirationแต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นถึง10 นาโนโมล/มก.โปรตีนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนู แคดเมี่ยมจะยับยั้งกระบวนการหายใจอย่างสมบูรณ์ (53) หรือที่ความเข้มข้นมากกว่า 10^{-8} M จะยับยั้งการหายใจอย่างมีนัยสำคัญ (52) นอกจากนี้แคดเมี่ยมยังมีคุณสมบัติทำให้เกิดuncouplingของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่นสามารถ recouplingได้ด้วย การใช้ EDTA หรือสารพวก dithiol (52)

การศึกษาโดยวิธีวัด spectrophotometry เชื่อว่าบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของแคดเมี่ยมอยู่ระหว่าง substrate และ cytochrome b (53)เชื่อว่าบริเวณหนึ่งระหว่าง substrate และ cytochrome b ซึ่งแคดเมี่ยมอาจมีผลการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น คือบริเวณของ flavin (54) โดยคิดว่า

แคดเมี่ยมไปรวมกับ flavin enzyme (55) การทดลองที่สนับสนุนคือแคดเมี่ยมในความเข้มข้น 50 µM จะทำให้ flavin enzyme เกือบทั้งหมด แต่ไม่ทั้งหมดถูกออกซิไดซ์ (54)

การศึกษาถึงผลของปรอทต่อไมโตคอนเดรีย พบว่าปรอทมีผลทำให้เกิดการบวมของไมโตคอนเดรีย (7) ซึ่งเป็นเพราะว่าปรอททำให้การจับของ magnesium ion กับ mitochondrial membrane สูญเสียไป ดังนั้นจึงมีผลเพิ่ม permeability ต่อ potassium ion (37)

Sone และคณะได้ทำการทดลองผลของ methyl mercury ต่อกระบวนการหายใจ พบว่า methyl mercury ในขนาด 10-50 นาโนโมล/มก. โปรตีนของไมโตคอนเดรียยับยั้ง state 3 respiration (56) มีผู้ศึกษาใช้ mersalyl ขนาด 30-80 มคม. พบว่ามีการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ electron ระหว่าง NADH และ coenzyme Q โดย mersalyl ไปจับกับ sulfhydryl group (-SH) ของ complex I ของลูกโซ่การหายใจ อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์สามารถกลับคืนได้ด้วย DTT หรือ mercaptoethanol แต่จลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่คืนกลับมาก็ต่างจากคุณสมบัติเดิมของมัน (7) Sone และคณะ ได้ศึกษาปรอทในความเข้มข้นสูงจะยับยั้งลูกโซ่การหายใจระหว่าง flavin และ cytochrome b (37)

มีการศึกษาให้ methyl mercury ในขนาด 5-10 มคก./มล. น้ำดื่ม กับหนูที่โตเต็มที่เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าทำให้เกิดการบวมของ proximal tubular cell mitochondria ,respiratory control ratio ลดลง และ cytochrome oxidase activity ลดลงเหลือเพียง 78% ใน cortical mitochondria (33)

นอกจากนี้ methyl mercury ขนาด 1.6 มคม/มก.โปรตีน สามารถยับยั้ง NADH และ succinate dehydrogenase (56) แต่ความเข้มข้นนี้มากกว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งลูกโซ่หายใจ และกระบวนการฟอสฟอริเลชั่น 16 และ 80 เท่าตามลำดับ การที่ปรอทชักนำให้เกิดการสะสม potassium ion ในไมโตคอนเดรียเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิด uncoupling ขึ้นด้วย (56)

ผลของแมงกานีสต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น พบว่าไมโตคอนเดรียที่มีการสะสมแมงกานีสมากประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าวจะลดลง ค่า ADP:O และ respiratory control ratio ลดลง (7)การทดลอง in vivo

โดยฉีด MnO_2 เข้าทางหลอดเลือดดำของสัตว์ทดลอง ปรากฏว่ามีการเปลี่ยนแปลง enzyme activity ในไมโตคอนเดรียของตับและสมอง พบว่าแมงกานีสยับยั้ง succinic dehydrogenase, succinic oxidase(7) ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น นอกจากนี้มีการทดลองในไมโตคอนเดรียจากตับของหนู โดยใช้ methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) พบว่ามีการยับยั้งที่บริเวณ site I ระหว่าง NADH และ ubiquinone ซึ่งสามารถคืนกลับปฏิกิริยาได้ โดยใช้ uncoupler ส่วน succinic dehydrogenase ที่ถูกยับยั้งโดยแมงกานีสสามารถคืนกลับได้ด้วย chelating agent เช่น EDTA หรือ ascorbate (57)

ผลการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 1 พบว่าแคดเมี่ยม , ปรอท และแมงกานีสต่างมีผลยับยั้ง state 3 และ state 3u respiration ของไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว ไม่ว่าจะใช้ glutamate + malate (ซึ่งเป็น NAD^+-linked substrates) หรือ succinate เป็น substrates state 3 respiration เป็นการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในขณะเกิดปฏิกิริยา oxidative phosphorylation หรือการสร้าง ATP นั่นเอง oxidative phosphorylation ประกอบไปด้วย 2 ปฏิกิริยาใหญ่ซึ่งควบคู่ (couple)กัน คือ oxidation ซึ่งประกอบด้วย 3 กระบวนการสำคัญคือ

1. การ transport ของ substrates จากภายนอกสู่ภายในไมโตคอนเดรีย
2. การ oxidize substrates ด้วย enzyme dehydrogenaseต่างๆ
3. การส่ง reducing equivalent ที่ได้จาก substrate dehydrogenation เข้าสู่ respiratory chain จนถึงออกซิเจนในที่สุด

กับ phosphorylation ซึ่งประกอบด้วย 2 กระบวนการสำคัญคือ

1. การ transport ของ substrates (ได้แก่ ADP และ P_i) จากภายนอกสู่ภายใจไมโตคอนเดรีย และ
2. การสร้าง ATP จาก ADP และ P_i โดย enzyme ATP synthase หรือ F_1F_o-ATPase

ดังนั้นการยับยั้ง state 3 respiration จึงเกิดจากการยับยั้งกระบวนการ oxidation และ/หรือ phosphorylation ส่วน state 3u respiration เป็นการใช้ออกซิเจน ในขณะที่ไมโตคอนเดรีย uncouple (กล่าวคือ oxidation ไม่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ควบคู่กับ phosphorylation ต่อไป) ดังนั้น state 3u respiration จึงเกิดจากปฏิกิริยา oxidation เพียงอย่างเดียว การยับยั้ง state 3u respiration จึงเกิดจากการยับยั้ง oxidation โดยไม่เกี่ยวข้องกับ phosphorylation แต่อย่างใด จากการที่โลหะหนักทั้งสามมีฤทธิ์ยับยั้ง state 3u respiration แสดงว่ากระบวนการ oxidation ถูกยับยั้ง ส่วนการยับยั้ง state 3 respiration ของโลหะหนักนั้นอาจเป็นผลจากการยับยั้ง oxidationเพียงอย่างเดียวหรือยับยั้งทั้ง oxidation และ phosphorylation ซึ่งถ้าเป็นในกรณีหลัง degree of inhibition ของ state 3 ควรจะมากกว่า state 3u respiration

จากผลการวิจัยเมื่อให้แคดเมี่ยมร่วมกับปรอท พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง state 3 และ state 3u respiration เพิ่มขึ้น ทั้งในกรณีที่ใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็น substrate และค่าการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการได้รับปรอทอย่างเดียวนั้นมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแคดเมี่ยมตัวเดียว อาจจะอธิบายได้ว่า ทั้งแคดเมี่ยมและปรอทเข้าไปเพิ่มฤทธิ์กันในการยับยั้งกระบวนการหายใจที่บริเวณระหว่าง substrate และ cytochrome b และในทำนองเดียวกันปรอทที่มีผลทำให้การยับยั้งการหายใจเพิ่มขึ้นเช่นกันเมื่อเทียบกับแคดเมี่ยมอย่างเดียว

ในกรณีของแมงกานีสเมื่อให้ร่วมกับแคดเมี่ยม พบว่ายับยั้ง state 3 respiration มากกว่าเมื่อได้รับแมงกานีสอย่างเดียว ส่วนผลต่อ state 3u เมื่อให้แมงกานีสร่วมกับแคดเมี่ยม ค่าการยับยั้งไม่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับแมงกานีสอย่างเดียว และมีผลทำให้การยับยั้งของแคดเมี่ยมลดลง จนเกือบเท่าผลที่เกิดจากแมงกานีสเพียงอย่างเดียวทั้งในกรณีที่ใช้ glutamate+ malate และ succinate เป็น substrate ผลดังกล่าวแสดงว่า แมงกานีสไปยับยั้งผลของแคดเมี่ยมที่มีต่อ state 3 u respir-tion ซึ่งกลไกยังไม่ทราบ แต่อาจเป็นไปได้ว่าแมงกานีสไปไล่ที่แคดเมี่ยมออกจากตำแหน่งที่แคดเมี่ยมไปมีผลต่อ state 3u respiration (คือ oxidation) นอกจากนั้น จากการที่แมงกานีสไม่มีผลยับยั้งฤทธิ์ของแคดเมี่ยมต่อ state 3 respiration ยังแสดงอีกว่าตำแหน่งหรือกลไกที่แคดเมี่ยมยับยั้ง state 3 และ state 3u respiration ไม่ควรจะเป็นตำแหน่งหรือกลไกที่เหมือนกัน

ผลการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น พบว่า เมื่อให้โลหะหนักร่วมกัน การยับยั้ง state 3 respiration เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาถึงปรอทหรือแมงกานีสอย่างเดียว พบว่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะยับยั้ง state 3

มากกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาดังกล่าว

2. กระบวนการกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซี่ยม

ไมโตคอนเดรียมีความสามารถเก็บสะสมแคลเซี่ยมเข้าไว้ในตัวเอง ซึ่งการเก็บสะสมดังกล่าว ต้องใช้พลังงานจาก substrate oxidation หรือจาก ATP hydrolysis ดังนั้นการเก็บสะสมแคลเซี่ยมของไมโตคอนเดรีย จึงมีความสัมพันธ์กับปริมาณของออกซิเจนที่ไมโตคอนเดรียใช้ไป ถ้าปริมาณแคลเซี่ยมเข้าสู่ไมโตคอนเดรียถูกยับยั้ง อัตราการใช้ออกซิเจนก็จะช้าลงตามไปด้วย

ดังที่กล่าวแล้วว่า ไมโตคอนเดรียมีความสามารถเก็บสะสมแคลเซี่ยม เพราะฉะนั้นถ้าต้องการทราบว่าสารใดมีผลต่อหน้าที่ของไมโตคอนเดรียหรือไม่ก็อาจใช้การกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมเป็นข้อบ่งชี้ได้อีกประการหนึ่ง มีการศึกษาพบว่าแคดเมี่ยมจะไปจับกับ low affinity binding site สำหรับแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรีย ดังนั้นจึงมีผลต่อการขนส่งแคลเซี่ยมเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย ส่วนผลของปรอทที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสะสมแคลเซี่ยมของไมโตคอนเดรียคือ ปรอทเพิ่ม permeability ของ inner membrane ต่อ monovalent cation เช่น การแลกเปลี่ยน cation กับ H^+มีผลเพิ่ม permeability ต่อ H^+ (37) และพบว่าปรอทอินทรีย์ในความเข้มข้นต่ำเหนี่ยวนำให้เกิดการ uptake ของ K^+ เข้าสู่ไมโตคอนเดรียเพราะฉะนั้นเกิดการสะสม K^+ มีผลทำให้สูญเสีย membrane potential (56)

ผลของแมงกานีสต่อการเข้าสู่ไมโตคอนเดรียของแคลเซี่ยม มีการศึกษาโดย Gavin และคณะ พบว่ากลไกในการยับยั้งการสะสมแคลเซี่ยมของแมงกานีส คือ แมงกานีสจะแย่งจับกับ uniporter ที่ใช้สำหรับการเข้าสู่ไมโตคอนเดรียของแคลเซี่ยม

จากผลการทดลองพบว่าแคดเมี่ยม, ปรอทและแมงกานีส มีผลยับยั้งการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมทุกตัว การยับยั้งเมื่อให้แคดเมี่ยมร่วมกับปรอทมีลักษณะเหมือนกับการได้รับปรอทอย่างเดียว ไม่ว่าจะใช้ glutamate+ malate หรือ succinate เป็น substrate และเกิดผลในลักษณะเดียวกัน ทั้งการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส กล่าวคือ ผลของแคดเมี่ยมไม่ไปเพิ่มกับผลของปรอทในกระบวนการนี้

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการหายใจโดยแคลเซี่ยมกับการยับยั้ง state 3u respiration ของปรอท ปรากฏว่ายับยั้งการหายใจโดยแคลเซี่ยมมากกว่ายับยั้ง state 3u respiration อย่างชัดเจน ซึ่งคาดว่าเป็นเพราะปรอทไปมีผลต่อทั้ง calcium uniporter และ protonmotive force

ผลการทดลองเมื่อให้แมงกานีสร่วมกับแคดเมี่ยม ต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยม เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็น substrate ทั้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าแคดเมี่ยมมีผลทำให้การยับยั้งกระบวนการดังกล่าวเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญ เมื่อความเข้มข้นของแมงกานีสเท่ากับ 2-10 μM และมีการยับยั้งกระบวนการนี้มากกว่าเมื่อเทียบกับstate 3u respiration อาจจะเป็นเพราะว่ามีผลรบกวนถึง calcium uniporter ด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gavin ที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่าแมงกานีสจะใช้ uniporter ชนิดเดียวกับ calcium ในการเข้าสู่ไมโตคอนเดรีย

สรุปในส่วนนี้คือ การให้แคดเมี่ยมร่วมกับปรอทจะไม่เพิ่มฤทธิ์กันในการยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรียโดยแคลเซี่ยม แต่การให้แคดเมี่ยมร่วมกับแมงกานีสจะเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการดังกล่าว

3. การทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase

Monoamine oxidase เป็นเอนไซม์ซึ่งจัดเป็น marker enzyme สำหรับ outer membrane ของไมโตคอนเดรีย ในปัจจุบันได้มีการแยกเอนไซม์นี้เป็น 2 ชนิดคือ monoamine oxidase -A และ monoamine oxidase -B

มีการศึกษาทดลองพบว่า ปรอทมีผลทำให้ activity ของ enzyme monoamine oxidase ลดลง(59) นอกจากนี้การศึกษา in vivo ถึงผลของแมงกานีสต่อ monoamine oxidaseพบว่า เพิ่ม activity ของ enzyme อย่างมีนัยสำคัญ (7) ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกศึกษาถึงผลของแคดเมี่ยม , ปรอท และแมงกานีส ต่อ monoamine oxidase enzyme แต่ละชนิด

จากผลการทดลองพบว่าปรอทและแคดเมี่ยม ยับยั้ง monoamine oxidase-A และเมื่อให้ร่วมกัน ปรากฏว่าแคดเมี่ยมเพิ่มการยับยั้ง activity ของเอนไซม์มากขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญ แต่เมื่อความเข้มข้นของปรอทมากขึ้น แคดเมี่ยมจะไม่มีผลเพิ่มการยับยั้งของปรอท ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่า ปรอทและแคดเมี่ยมไปจับกับหมู่ -SH ของโปรตีน

และเมื่อความเข้มข้นของปรอทมากขึ้น SH- group จะถูกจับโดยปรอทจนหมด ดังนั้นเมื่อให้แคดเมี่ยมร่วมเข้าไป จึงไม่เพิ่มการยับยั้งให้มากขึ้น จากผลการทดลอง แมงกานีสมีผลยับยั้ง monoamine oxidase-A activity เล็กน้อย และเมื่อให้ร่วมกันกับแคดเมี่ยม การยับยั้งเอนไซม์เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญ

ในกรณีของ monoamine oxidase-B พบว่าปรอทที่ความเข้มข้น 10 μM ไม่มีผลยับยั้ง แต่มีผลกระตุ้น monoamine oxidase B activity ได้เล็กน้อย การให้ร่วมกันกับแคดเมี่ยม ไม่ทำให้การยับยั้ง activity ของ enzyme เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการได้รับปรอทอย่างเดียว แต่ที่ความเข้มข้นปรอท 10 μM การให้ร่วมกับแคดเมี่ยมมีผลยับยั้งactivity ของเอนไซม์ ซึ่งคงเป็นผลจากตัวแคดเมี่ยมเอง ผลของการให้แคดเมี่ยมร่วมกับแมงกานีสไม่แตกต่างจากการได้รับแมงกานีสตัวเดียว มีผู้ทำการศึกษาดังที่กล่าวไว้ในตอนต้นว่าแมงกานีสมีผลทำให้ monoamine oxidase activity เพิ่มขึ้นซึ่งขัดแย้งกับการทดลองในครั้งนี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการทดลองดังกล่าวนั้นเป็นการทดลอง in vivo ส่วนการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลอง in vitro เนื่องจากการทดลอง in vitro เป็น direct effect แต่การทดลอง in vivo อาจเป็น direct หรือ indirect effect ก็ได้ สภาพในการทดลองต่างกัน ดังนั้นจึงอาจมีผลต่อการทดลองได้

4. การทำงานของเอนไซม์ ATPase(F_1F_o-ATPase หรือ ATP synthase)

เอนไซม์ ATPase เป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่บริเวณ FiFo complex ของ inner membrane ของไมโตคอนเดรีย ในสภาวะปกติ เอนไซม์ ATPase มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้าง ATP จาก ADP+P_i แต่ในสภาวะที่ protonmotive สลายไปหรือลดลง เช่นในกรณีที่ได้รับ uncoupler หรือ aged mitochondria เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยากลับ คือการเร่งสลาย ATP ไปเป็น ADP+P_i

จากการศึกษาพบว่าแคดเมี่ยม มีคุณสมบัติสามารถเลียนแบบแมกนีเซี่ยม ซึ่งเป็น cofactor ที่จำเป็นสำหรับกระตุ้น F_1-ATPase activity ในความเข้มข้นต่ำ แคดเมี่ยมสามารถกระตุ้นเอนไซม์ ATPase แต่เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 10 mM จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase (12)และพบว่าแคดเมี่ยม ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ มีคุณสมบัติเป็น uncoupling agent (53)

คุณสมบัติของปรอทที่กล่าวมาแล้วคือ ทำให้ inner membrane permeable มากขึ้น มีผลเพิ่ม H^+ และ K^+ permeability (37) การศึกษาในไมโตคอนเดรีย

ของหนู พบว่า methyl mercury มีผลยับยั้ง Pi-ATP exchange อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 30 นาโนโมล/มก.โปรตีนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนู (56)

จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าเอนไซม์ ATPase ถูกกระตุ้นโดยแคดเมี่ยม ปรอท และแมงกานีส ทั้งในกรณีที่กระตุ้น และไม่ได้กระตุ้นด้วย uncoupler คือ DNP และเมื่อให้ร่วมกัน ปรากฏว่าการกระตุ้นเอนไซม์ดังกล่าว มากกว่าเมื่อได้รับโลหะหนักอย่างเดียว

เนื่องจาก ATP hydrolysis โดยไมโตคอนเดรีย(ปฏิกริยานี้สามารถกระตุ้นได้ด้วยการเติมสารจำพวก uncoupler เช่น DNP) เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของ phosphorylation (คือการสร้าง ATP จาก ADP+P_i) ซึ่งเกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์เดียวกัน คือ F_1F_o-ATPaseหรือ ATP synthase ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ ATP synthase อย่างเช่น oligomycin จึงยับยั้งทั้ง state 3 respiration (โดยการยับยั้ง phosphorylation) และ ATPase activity ของไมโตคอนเดรียจากการที่โลหะหนักทั้งสาม เมื่อให้อย่างเดียวหรือให้ร่วมกันก็ดีไม่สามารถยับยั้ง ATPase activiry ได้ ย่อมชี้แนะว่าโลหะหนักดังกล่าว ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของ ATP synthase หรืออีกนัยหนึ่งไม่มีผลยับยั้ง phosphorylation reaction นั่นเอง ดังนั้นการยับยั้ง state 3 respiration โดยโลหะหนักดังกล่าว จึงควรเป็นผลมาจากการยับยั้งปฏิกิริยา oxidation แต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งในกรณีเช่นนี้ ก็ควรจะคาดหมายว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง state 3 และ state 3 u respiration ควรจะใกล้เคียงกัน แต่จากการวิจัยนี้ พบว่าโลหะหนักทั้งสาม มักจะยับยั้ง state 3 มากกว่า state 3u respiration ผลเช่นนี้ชี้แนะว่า โลหะหนักควรมีผลยับยั้ง phosphorylation หรือการทำงานของ ATP synthase ด้วยเช่นกัน ข้อมูลที่ดูขัดแย้งกันเองนี้ นับว่าน่าสนใจ อย่างน้อยในแง่ทฤษฎี และสมควรที่จะได้รับการศึกษาวิจัยต่อไป ซึ่งอาจจะทำให้รู้ถึงการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase ได้ดียิ่งขึ้น

5. การคืนกลับของกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น เมื่อใช้ EDTA และ DTT

การยับยั้ง succinic dehydrogenase โ ดยแมงกานีส สามารถยับยั้งได้ด้วย chelating agent เช่น EDTA , CDTA (7) การเกิด uncoupling และการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น เนื่องจากแคดเมี่ยมสามารถแก้ไขได้โดยใช้ EDTA หรือ dithiol (52,53)ส่วนการยับยั้งกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น

ของปรอท สามารถแก้ไขโดยใช้สารที่มี sulfhydryl group (-SH group) (56)

จากผลการทดลองแสดงว่า EDTA และ DTT สามารถลดการยับยั้ง state 3 respiration โดยโลหะหนักทั้งสามที่ให้อย่างเดียว หรือให้ร่วมกันได้ ยกเว้นกรณีที่ให้ปรอทอย่างเดียวที่ EDTA ไม่มีผล การที่ให้ EDTA หรือ DTT ก่อนโลหะหนัก ให้ผลมากกว่าการให้หลังโลหะหนัก ชี้แนะว่าความสามารถของ EDTA หรือ DTT ในการจับกับโลหะหนัก หรือดึงโลหะหนักออกจากไมโตคอนเดรียลดลง หลังจากที่โลหะหนักจับกับไมโตคอนเดรียแล้ว หรืออาจเป็นไปได้ว่า เมื่อไมโตคอนเดรียได้รับโลหะหนักก่อน โลหะหนักนี้จะถูกขนส่งเข้าไป และออกฤทธิ์ในไมโตคอนเดรีย ทำให้ EDTA และ DTT ที่ให้ตามเข้าไป ออกฤทธิ์ได้ไม่ดี เนื่องจากสารเหล่านี้อาจเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนชั้นในของไมโตคอนเดรียได้ไม่ดี ก็เป็นได้

จากผลการทดลองทั้งหมด จะเห็นว่าแคดเมี่ยม ปรอท และแมงกานีส มีผลต่อหน้าที่ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรียทั้งสิ้น การได้รับในลักษณะร่วมกัน จะมีผลเสียต่อหน้าที่ต่าง ๆ ของไมโตคอนเดรียมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชั่น ซึ่งเป็นหน้าที่สำคัญที่สุดของไมโตคอนเดรียจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถชี้ให้เห็นว่า การที่ร่างกายได้รับสารเหล่านี้มากกว่า 1 ชนิด ในเวลาเดียวกัน อาจก่อให้เกิดอันตรายมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษา in vitro เป็นการดูผลแบบโดยตรง(direct effect) ดังนั้นการที่จะนำมาแปลผลถึงในร่างกายอาจจะไม่สัมพันธ์กัน เนื่องจากการมีระบบป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิต ทำให้ผลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับการศึกษา in vitro ก็ได้ ดังนั้นเพื่อยืนยันผลการศึกษาดังกล่าว ว่ามีผลอย่างไรในร่างกาย จึงควรมีการศึกษาต่อไปแบบ in vivo ประกอบด้วย ซึ่งจะทำให้ข้อมูลทั้งหมดสมบูรณ์มากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย