

ผลของแคดเมียมและซีลีเนียมต่อระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันของตับแฮมสเตอร์

Effect of Cadmium and Selenium on Hepatic Antioxidative Enzymes of Hamsters

วรรณา ศิริแสงตระกูล (Wana Sirisangtrakul)^a

บังอร ศรีพานิชกุลชัย (Bungorn Sripanidkulchai)^{b *}

^a งานบริการทางวิชาการและวิจัย คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Service and Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University

^b ภาควิชาเภสัชเคมี และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Department of Pharmaceutical Chemistry, Center for Research and

Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลของแคดเมียมต่อระบบเอนไซม์ที่ใช้ต้านออกซิเดชันของตับแฮมสเตอร์ และฤทธิ์ของซีลีเนียมต่อผลของแคดเมียมขนาดต่ำ ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การให้แคดเมียมขนาด 1-5 mg/kg ทางช่องท้อง ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดสชนิดที่ต้องการซีลีเนียม (Se-GPx) ในตับแฮมสเตอร์เพศผู้ แต่ลดการทำงานของเอนไซม์ในเพศเมีย และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเตส (GR) ในเพศผู้ ส่วนในเพศเมียเพิ่มขึ้นเฉพาะที่ความเข้มข้น 2.5 mg/kg ส่วนเอนไซม์แคตาเลส (CAT) นั้น ไม่เปลี่ยนแปลงในเพศผู้ แต่ลดลงในเพศเมีย และไม่มีผลต่อระดับของกลูตาไทโอนในสัตว์ทดลองทั้งสองเพศ

การศึกษาผลของซีลีเนียมต่อพิษแคดเมียมในขนาดต่ำ 0.5 mg/kg พบว่าปริมาณแคดเมียมในตับของกลุ่มที่ได้รับซีลีเนียมร่วมกับแคดเมียมต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับแคดเมียมเพียงอย่างเดียวในทั้งสองเพศ Se-GPx ในตับแฮมสเตอร์เพศผู้ที่ได้รับแคดเมียมหรือซีลีเนียมเพียงอย่างเดียว ไม่แตกต่างจากของกลุ่มควบคุม แต่การให้โลหะทั้งสองชนิดร่วมกันทำให้ Se-GPx ลดลง ส่วนในเพศเมีย พบว่าการให้ซีลีเนียมเพียงอย่างเดียว หรือให้ร่วมกับแคดเมียม สามารถเพิ่มการทำงานของ Se-GPx ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ GR ในเพศผู้แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่กลับพบว่าในเพศเมียนั้น การได้รับแคดเมียมหรือซีลีเนียมเพียงอย่างเดียว หรือให้โลหะ 2 ชนิด ร่วมกันทำให้ GR ลดลง ส่วนผลต่อ CAT นั้น พบว่าเฉพาะกลุ่มที่ให้ซีลีเนียมร่วมกับแคดเมียมมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ GSH ในเพศผู้ทุกกลุ่มการทดลอง แต่การให้ซีลีเนียมเพียงอย่างเดียวหรือให้แคดเมียมร่วมกับซีลีเนียมทำให้ GSH สูงขึ้นในเพศเมีย

คำสำคัญ : แคดเมียม, ซีลีเนียม, ต้านออกซิเดชัน, แฮมสเตอร์, กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส, กลูตาไทโอนรีดักเตส, แคตาเลส, กลูตาไทโอน

* ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ : โทรศัพท์ 043-362091, โทรสาร 043-202379

Corresponding author : Tel: 043-362091, Fax: 043-202379, e-mail: bungorn@kku.ac.th

Abstract

This research aimed to study the toxicity of cadmium on hepatic antioxidant enzymes of hamsters and to investigate the protective effect of selenium on low dose cadmium administration on these enzyme systems. For acute toxicity studies, intraperitoneal administration of 1, 2.5 and 5 mg/kg of cadmium did not change selenium dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) activity of males, whereas the enzyme activity decreased in females.

Cadmium at every doses of administration increased glutathion reductase (GR) activity in males but only at 2.5 mg/kg can increase this enzyme activity in females. Moreover catalase activity did not change in males but decreased in females. There were no changes in hepatic glutathione levels of both genders. An administration of selenium with low dose cadmium (0.5 mg/kg) can decrease the hepatic cadmium levels in both sexes. Hepatic Se-GPx activities of male animals receiving either cadmium or selenium were not different from those of the control group. However, Se-GPx activity of male animals receiving cadmium plus selenium decreased. In contrast, hepatic Se-GPx activities of females increased in selenium alone or selenium plus cadmium groups. When compared to the control, there were no changes in GR activities of all studied male animals. But GR activities decreased in cadmium, selenium, and cadmium plus selenium treated animals. Catalase activity of selenium plus cadmium group was found to be lower than that of the control in both males and females. When compared to the control, GSH levels of all male treated animals did not change. Whereas in females, GSH levels increased in both selenium and selenium plus cadmium treated groups.

Key words: cadmium, selenium, antioxidant, hamster, glutathione peroxidase, glutathione reduction, catalase, glutathione.

บทนำ

อนุมูลอิสระ เป็นอนุมูลที่มีความว่องไวเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาในร่างกาย หากมีปริมาณมากจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Halliwell, 1994) เกิดการทำลายชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ ไขมัน และโปรตีน ทำให้เซลล์ถูกทำลาย เกิดการชรา และเป็นโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น หลอดเลือดหัวใจอุดตัน ระบบประสาทเสื่อม และมะเร็ง เป็นต้น (Ward, Peters, 1994) ร่างกายมีระบบต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 ระบบ คือ ระบบเอนไซม์ และระบบที่ไม่ใช่เอนไซม์

(Kaim, Schwederski, 1994) เอนไซม์ที่สำคัญในระบบเอนไซม์ คือ catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) และ superoxide dismutase (SOD) สำหรับเอนไซม์ GPx มีทั้งชนิดที่ต้องการ (Se-GPx) และไม่ต้องการซีลีเนียมเป็นโคแฟกเตอร์ และในการทำลายอนุมูลอิสระโดยเอนไซม์เหล่านี้ยังต้องการกลูตาไทโอนร่วมด้วย แคดเมียมเป็นโลหะที่มีความเป็นพิษสูง จัดเป็นสารก่อมะเร็งในคนในกลุ่ม 2a (IARC, 1993) การได้รับ

แคดเมียมของคนมีได้หลายทาง ส่วนใหญ่จากการปนเปื้อนของแคดเมียมในอาหาร รองลงมาเป็นจากอากาศ ควันบุหรี่ และน้ำ (Groten, Bladeren, 1994) ในประเทศไทยมีรายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารทะเล (Vongbuddhapitak, 1993) และมีการคำนวณว่าคนไทยอาจได้แคดเมียมจากการบริโภคกุ้งทะเลสูงถึง 46 μg ต่อวัน (Pornsuttijanya, Jaengsawang, 1994) และจากพืชสูงถึง 28.83 μg ต่อวัน (Chokesanthaporn, 1988) มีรายงานแสดงว่าประชากรในบางพื้นที่ เช่น กรุงเทพฯ และอุบลราชธานี อาจได้รับแคดเมียม 16.1 และ 15.01 μg ต่อวันตามลำดับ (Suprapan, 1991; Suphanithasnaporn, 1995) เนื่องจากแคดเมียมมีความเป็นพิษ และอาจปนเปื้อนในปัสสาวะ หรือดินที่ใช้เพาะปลูกพืชสมุนไพร จึงมีข้อกำหนดด้านมาตรฐานสมุนไพรที่ใช้บริโภคควรมีแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ppm (WHO 1999; WHO 2004) จึงจะปลอดภัย แคดเมียมมีการสะสมได้ดีในตับ โดยสามารถจับกับโปรตีน metallothioneine และกระจายไปทั่วร่างกาย มีความเป็นพิษสูงโดยเฉพาะต่อไต ปอด และอวัยวะ (Cadmium ATSDR, 2000; Waalkes, 2000) กลไกที่แคดเมียมทำให้เป็นมะเร็งยังไม่ชัดเจนแต่แคดเมียมเป็นพิษต่อเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนระบบเอนไซม์ของเซลล์จึงเชื่อว่ามีผลต่อระบบสัญญาณภายในเซลล์ (Beyermann, Hechtenberg, 1997) นอกจากนี้แคดเมียมยังทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (Amoruso et al, 1982; Zhong et al, 1990) และรบกวนระบบต้านอนุมูลอิสระ (Stohs, Bagchai, 1995)

ซิงค์เป็นธาตุที่จำเป็นต่อคนเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ คือ Se-dependent GPx (Se-GPx) (Rotruck et al, 1973) มีการนำซิงค์มาใช้เป็นสารต้านมะเร็ง เนื่องจากสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี และยังป้องกันพิษของ

โลหะหนักได้ (Harvard Study, 2000; Selenium, 2000) วรรณ และบังอร (2548) ได้รายงานถึงผลของซิงค์ที่ช่วยลดการสะสมของแคดเมียมในตับแฮมสเตอร์ และเคยมีรายงานว่าซิงค์สามารถต้านการลดลงของเอนไซม์ GPx และ CAT จากผลของแคดเมียมในตับหนูแรทเพศผู้ได้ (Ognjanovic et al, 1995) ดังนั้น งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของซิงค์ต่อการเกิดพิษของแคดเมียมต่อระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับแฮมสเตอร์ทั้งในเพศผู้ และเพศเมีย เนื่องจากแฮมสเตอร์เป็นสัตว์ทดลองที่มีความไวต่อสารพิษ (Chengelis, 1992) และยังใช้เป็นรูปแบบศึกษากลไกการเกิดมะเร็งที่ก่อมะเร็งในคน

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. สารเคมี

สารเคมีที่เป็นผลิตภัณฑ์ของ Merck (Germany) คือ nitric acid (ultrapure), cadmium chloride monohydrate (extra pure), folin phenol reagent; สารเคมีจาก Fluka Chemika คือ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); สารเคมีที่เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma (USA) คือ bovine serum albumin (BSA), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), glutathione reductase (GR), Tris -HCl, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), sodium dithiotrietol (DTT), sodium selenite; และสารเคมีอื่นๆ เป็น AR grade

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

2.1 แฮมสเตอร์ทั้งเพศผู้และเพศเมียชนิด Syrian Golden อายุ 7-8 สัปดาห์ ได้จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และตลอดการทดลองนี้ได้เลี้ยงในภาวะที่มี dark-light cycle ที่ $25 \pm 5^\circ\text{C}$ และให้อาหารเม็ดและน้ำ ad libitum

2.2 การทดสอบขนาดของแคดเมียม ใช้สัตว์ทดลอง 4 กลุ่มๆ ละ 7 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ให้ 0.9% โซเดียมคลอไรด์ทางช่องท้อง กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ให้แคดเมียม (ในรูปแคดเมียมคลอไรด์ที่ละลายใน 0.9% โซเดียมคลอไรด์) ขนาด 1, 2.5 และ 5 mg/kg ทางช่องท้อง จากนั้นตรวจดูอาการและพฤติกรรมของสัตว์ทดลองตลอดเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 2 วัน นำสัตว์ทดลองทั้งคอกอาหารมาทำให้สลบลึกด้วย โซเดียมเบนโทราบีตอล จากนั้นเปิดช่องท้องทำการสวนล้างเข้าทางหลอดเลือดดำด้วย 1.15% โพตัสเซียมคลอไรด์ที่เย็น จากนั้นเก็บตับซังน้ำหนัก และแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว เก็บไว้ที่ -70°C

2.3 การทดลองผลของซิลิเนียมต่อแคดเมียม ใช้สัตว์ทดลอง 4 กลุ่มๆ ละ 7 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมให้ 0.9% โซเดียมคลอไรด์ทางช่องท้อง กลุ่มที่ 2 ให้แคดเมียมขนาด 0.5 mg/kg ทางช่องท้อง กลุ่มที่ 3 ให้ซิลิเนียม (ในรูปโซเดียมซิลิไนด์ที่ละลายใน 0.9% โซเดียมคลอไรด์) ขนาด 0.5 mg/kg โดยการป้อนเข้าทางปากด้วย gastric gavage tube กลุ่มที่ 4 ให้ซิลิเนียมเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 3 ต่อมาอีก 2 ชั่วโมงให้แคดเมียมขนาด 0.5 mg/kg ทางช่องท้อง ต่อมาอีก 1 สัปดาห์ให้ซิลิเนียมครั้งที่สองในขนาดเดิมกับสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 3 และ 4 เลี้ยงสัตว์ทดลองไว้ครบ 2 สัปดาห์ นำสัตว์ทดลองทั้งคอกอาหารมาทำให้สลบลึกเก็บตัวอย่างตับเช่นเดียวกับข้อ 2.2

3. การวัดปริมาณแคดเมียมและซิลิเนียม

3.1 การเตรียมตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างตับ (1-2 กรัม) มาทำให้แห้ง บดละเอียด จากนั้นย่อยใน 50% กรดไนตริก ที่อุณหภูมิ 120°C จนได้สารละลายใส จากนั้นทำให้แห้ง และเจือจางด้วย 0.1 M กรดไนตริก

3.2 การวัดระดับแคดเมียมและซิลิเนียม นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 มาหาปริมาณโลหะทั้งสองชนิด โดยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์บชันที่ใช้กราฟิฟเฟอร์เนส (Spectra AA640Z, Varian) ตามวิธีของวรรณ และบังอร (2548)

4. การวัดการทำงานของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน

เตรียมเนื้อเยื่อตับให้ได้ส่วนไซโตซอล และส่วนไมโครโซม ตามวิธีของบังอร และคณะ (2548) และนำมาทดสอบต่อ ดังนี้

4.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์ *Se-GPx* ใช้วิธีของ Mannervik (1985) โดยเติมไซโตซอล (มีโปรตีน 20-30 μg) ในส่วนผสม ที่มี 0.1 M Tris HCl buffer, 50 μM NaN_3 , 3 unit ของ GR, 160 μM NADPH, 1 mM H_2O_2 จากนั้นเติม 1 mM GSH วัดการดูดกลืนแสงที่ 340 nm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นคำนวณหา specific activity โดยใช้ค่า molar extinction coefficient ที่ $6.2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ แสดงค่าเป็น nmole/min/mg โปรตีน

4.2 การวัดการทำงานของเอนไซม์ *GR* ใช้วิธีของ Carberg and Mannervik (1985) โดยนำไซโตซอล (มีโปรตีน 10-20 μg) เติมนลงในส่วนผสมของ 1 mM EDTA, 1 mM GSSG ใน 0.1 mM phosphate buffer เติมน 160 μM NADPH เพื่อเร่งปฏิกิริยา วัดการดูดกลืนแสงที่ 340 nm ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที คำนวณค่า specific activity โดยใช้ค่า molar extinction coefficient ที่ $6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ แสดงค่าเป็น $\mu\text{moles/min/mg}$ โปรตีน

4.3 การวัดการทำงานของเอนไซม์ *catalase* ใช้วิธีของ Beers and Siger (1985) โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของ H_2O_2 ที่เป็น substrate ที่ช่วงคลื่น 240 nm โดยใช้ส่วนไซโตซอล (มีโปรตีน 10 μg) ผสมกับ 9 mM H_2O_2 ใน 0.05 M phosphate buffer คำนวณค่า specific activity เป็น $\mu\text{moles/min/mg}$ โปรตีน

5. การหาปริมาณ GSH

ใช้วิธีของ Cohn and Lyle (1966) โดยเติม 0.3 μm EDTA ลงในส่วนไซโตซอล (มีโปรตีน 10-20 mg) จากนั้นตกตะกอนด้วยการเติม 10% meta-phosphoric acid 0.25 ml และปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g, 10 นาที 4°C นำส่วนใสมา 1 ml เพื่อเจือจางให้มีโปรตีน 1-2 mg ด้วย 0.1 M phosphate buffer และปรับ pH 7-7.5

นำตัวอย่างเจือจางนี้มาเติม 0.1 M phosphate buffer 0.9 ml, 0.1% o-phthalaldehyde 0.1 ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำส่วนผสมไปวัดในเครื่อง spectrofluorometer โดยใช้ excite wavelength ที่ 350 nm และวัดที่ 420 nm กำหนดค่า GSH โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงค่าเป็น $\mu\text{g}/\text{mg}$ โปรตีน

6. การทดสอบทางสถิติ

แสดงค่าเป็น $\text{mean} \pm \text{SE}(n)$ และ ใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) ทดสอบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม โดยกำหนดค่า p ที่น้อยกว่า 0.05

ผลการทดลอง

1. ผลของแคดเมียมต่อเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน และ กลูตาไทโอน

การได้รับแคดเมียมขนาด 1-5 mg/kg ไม่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ Se-GPx ในเพศผู้เปลี่ยนแปลง

ไปจากกลุ่มควบคุม แต่ในเพศเมียพบว่าการทำงานของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลง โดยเห็นความแตกต่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 1 และ 5 mg/kg ในขณะที่พบว่าการทำงานของเอนไซม์ GR ในเพศผู้เพิ่มขึ้น และมีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้น 5 mg/kg ส่วนในเพศเมียแม้จะพบว่าลดลงเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นที่ความเข้มข้น 2.5 mg/kg นั้น กลับเพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ (ตารางที่ 1) การได้รับแคดเมียมไม่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ CAT ในเพศผู้แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้จะมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้น 1 และ 2.5 mg/kg แต่กลับเพิ่มขึ้นในที่ความเข้มข้น 5 mg/kg นอกจากนี้ยังพบว่าแคดเมียมลดการทำงานของเอนไซม์ CAT ชัดเจนในเพศเมียทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ และพบว่าแคดเมียมไม่มีผลต่อปริมาณกลูตาไทโอนในทั้งเพศผู้ และเพศเมีย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การทำงานของเอนไซม์ Se-GPx และ GR ในตับแฮมสเตอร์ที่ได้รับแคดเมียม

Sex	Dose (mg/kg)	Se-GPx ¹	GR ¹
male	Control	2.36 $\pm$ 0.14(7)	0.60 $\pm$ 0.04(7)
	1	2.30 $\pm$ 0.215(7)	0.62 $\pm$ 0.05(7)
	2.5	2.54 $\pm$ 0.15(7)	0.73 $\pm$ 0.04(7)
	5.0	2.45 $\pm$ 0.32(5)	0.87 $\pm$ 0.11 ^{a,b} (5)
female	Control	2.33 $\pm$ 0.16(7)	0.55 $\pm$ 0.06(7)
	1	1.95 $\pm$ 0.08 ^a (7)	0.49 $\pm$ 0.03(7)
	2.5	2.31 $\pm$ 0.14 ^b (7)	0.63 $\pm$ 0.05 ^b (7)
	5.0	1.76 $\pm$ 0.04 ^{a,c} (5)	0.52 $\pm$ 0.02(5)

¹ แสดงค่าเป็น $\text{mean} \pm \text{SE}(n)$ ในหน่วย $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein

^a มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

^b มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับแคดเมียม 1 mg/kg ($p < 0.05$)

^c มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับแคดเมียม 2.5 mg/kg ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ catalase และ ปริมาณ GSH ในตับแฮมสเตอร์ที่ได้รับแคดเมียม

Sex	Dose(mg/kg)	CAT ¹	GSH ²
male	control	0.65±0.05(7)	6.18±0.36(7)
	1.0	0.56±0.04(7)	6.05±0.77(7)
	2.5	0.61±0.02(7)	5.99±0.37(7)
	5.0	0.71±0.06 ^b (5)	7.89±0.86(5)
female	control	0.62±0.04(7)	5.47±0.63(7)
	1.0	0.47±0.02 ^a (7)	4.54±0.35(7)
	2.5	0.52±0.04 ^a (7)	5.68±0.28(7)
	5.0	0.46±0.02 ^a (5)	5.34±0.50(5)

^{1,2} แสดงค่าเป็น mean±SE(n) ในหน่วย $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein และ $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein ตามลำดับ

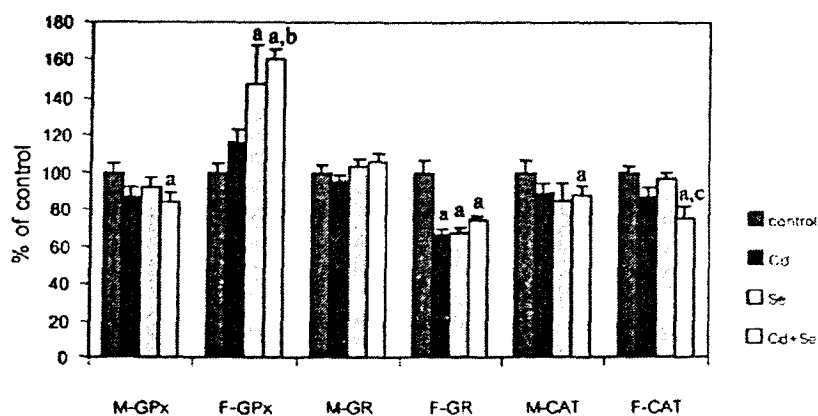
^a มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

^b มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับแคดเมียม 1 mg/kg ($p < 0.05$)

2. ผลของซลิเนียมเมื่อให้ร่วมกับแคดเมียมต่อเอนไซม์ ต้านออกซิเดชั่น และกลูตาไทโอน

การให้ซลิเนียม หรือแคดเมียมเพียงอย่างเดียวไม่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ Se-GPx ในแฮมสเตอร์เพศผู้ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่การให้ซลิเนียมร่วมกับแคดเมียมทำให้เอนไซม์ทำงานลดลง ในเพศเมียพบว่า การให้ซลิเนียมอย่างเดียวหรือให้ซลิเนียมร่วมกับแคดเมียมมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ส่วนผลต่อเอนไซม์ GR ในเพศผู้ นั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในทุกกลุ่มการทดลอง แต่กลับพบว่าในเพศเมียการให้แคดเมียม หรือซลิเนียมเพียงอย่างเดียว หรือให้ซลิเนียมร่วมกับแคดเมียมทำให้เอนไซม์ GR ทำงานลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับผลต่อ CAT นั้น พบว่ากลุ่มที่ได้รับซลิเนียมร่วมกับแคดเมียม

ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) ระดับของ GSH ในเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มทดลอง แต่พบว่าในเพศเมียมีการเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับซลิเนียมอย่างเดียว หรือให้ร่วมกับแคดเมียม สำหรับปริมาณของโลหะทั้งสองชนิดในตับนั้นพบว่า การให้ซลิเนียมร่วมกับแคดเมียมมีผลลดแคดเมียมในตับแฮมสเตอร์ทั้ง 2 เพศ โดยลดในเพศผู้ได้ดีกว่าเพศเมีย ส่วนระดับซลิเนียมในตับแฮมสเตอร์ที่ได้รับซลิเนียมร่วมกับแคดเมียม นั้น ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะซลิเนียมเพียงอย่างเดียวในทั้ง 2 เพศ แต่มีความแตกต่างทางสถิติเฉพาะในเพศเมีย (ตารางที่ 3)



รูปที่ 1 เปรียบเทียบเอนไซม์ Se - GPx, GR และ CAT ในตับแฮมสเตอร์ที่ได้รับซิงค์และแคดเมียม a,b,c แสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับแคดเมียม และกลุ่มที่ได้รับซิงค์ตามลำดับ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3 ระดับของกลูตาไทโอน (GSH) แคดเมียม (Cd) และซิงค์ (Se) ในตับแฮมสเตอร์

Sex	Treatment	GSH ¹	Cd ²	Se ²
male	Control	4.13±0.28 (7)	0.17±0.03 (7)	0.78±0.13 (6)
	Cd	4.78±0.34(7)	21.25±2.84 ^a (7)	0.74±0.07(7)
	Se	3.88±0.34(7)	0.17±0.02 ^b (7)	1.26±0.13 ^{a,b} (6)
	Cd+Se	4.15±0.24(7)	9.66±2.00 ^{a,c} (7)	1.04±0.06 ^b (7)
female	Control	4.15±0.34 (6)	0.23±0.02(6)	0.94±0.08 (6)
	Cd	4.89±0.27(7)	26.54±1.85 ^a (7)	1.08±0.11(7)
	Se	5.45±0.33 ^a (7)	0.37±4.14 ^b (7)	1.53±0.14 ^{a,b} (6)
	Cd+Se	5.68±0.37 ^a (7)	20.44±1.51 ^{a,b,c} (7)	0.83±0.03 ^c (6)

¹ แสดงค่าเป็น mean±SE(n) ในหน่วย µg/mg protein

² แสดงค่าเป็น mean±SE(n) ในหน่วย µg/g dry weight

^a มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

^b มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับแคดเมียม ($p < 0.05$)

^c มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับซิงค์ ($p < 0.05$)

วิจารณ์และสรุปผล

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษต่อแอสเตอร์ เมื่อได้รับขนาดสูง 1-5 mg/kg มีการสะสมในตับตามขนาดที่ได้รับ (วรรณ และ บังอร, 2548) ส่วนผลต่อระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันที่ศึกษาคือ Se-GPx, GR และ CAT นั้น พบว่าแคดเมียมรบกวนระบบเอนไซม์แตกต่างกันในเพศผู้ และเพศเมีย โดยลดการทำงานของเอนไซม์ Se-GPx และ CAT เฉพาะในแอสเตอร์เพศเมียคล้ายคลึงกับผลต่อดับ และไตของหนูแรทเพศผู้ (Ognjanovic et al 1995; Stajn et al 1997) เพิ่ม GR ในเพศผู้เฉพาะที่ความเข้มข้นสูง โดยไม่มีผลต่อเพศเมีย และไม่มีผลต่อระดับกลูตาไทโอนในทั้ง 2 เพศ จึงกล่าวได้ว่า พิษเฉียบพลันของแคดเมียมขนาดสูงรบกวนระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในแอสเตอร์เพศเมียมากกว่าในเพศผู้ ซึ่งผลที่ได้คล้ายคลึงกับที่เคยรายงานในหนูแรทที่ได้รับแอลกอฮอล์ (Polavarapu et al, 1998) อาจกล่าวได้ว่าระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในเพศเมียมีความไวต่ออนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นกว่าในเพศผู้ และชี้แนะว่าแคดเมียมอาจเพิ่มภาวะเครียดต่อดับโดยทำให้ระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ลดลง

การทดสอบผลที่ซิลิเนียมอาจด้านฤทธิ์ของแคดเมียมต่อระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันนั้น พบว่าระบบเอนไซม์เหล่านี้ในเพศเมีย มีความไวต่อซิลิเนียมคล้ายคลึงกับผลต่อระบบเอนไซม์ที่เมตาโบไลซ์สารแปลกปลอม (บังอร และคณะ 2548) ผลต่อ Se-GPx, CAT ในตับแอสเตอร์เพศผู้ที่ได้รับซิลิเนียมร่วมกับแคดเมียม ในการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากที่เคยมีการรายงานในตับหนูแรทนั้น แสดงถึงการตอบสนองที่แตกต่างกันในสัตว์ทดลองแต่ละชนิด การให้ซิลิเนียมร่วมกับแคดเมียมสามารถลดการสะสมของแคดเมียมในตับแอสเตอร์ได้ทั้ง 2 เพศ และยังส่งผลให้ระดับ

ซิลิเนียมต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับซิลิเนียมอย่างเดียว ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ชี้แนะว่า ทั้งซิลิเนียม และแคดเมียมสามารถแย่งกันจับกับโปรตีน metallothionein ในตับ ดังที่เคยพบรายงานในหนูแรท (Cahill et al, 1983; Viljoen, Tappel, 1988; Wahba et al, 1993) ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าแคดเมียมมีความเป็นพิษสูง แม้จะให้ขนาดสูงหรือต่ำก็ส่งผลกระทบต่อระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันตามเพศของสัตว์ทดลอง การให้ซิลิเนียมสามารถต้านพิษของแคดเมียมโดยลดปริมาณสะสมของแคดเมียมในตับ และเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อแคดเมียมของระบบเอนไซม์ของตับแอสเตอร์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ หน่วยสัตวทดลอง คณะแพทยศาสตร์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร และหน่วยบริการวิชาการและวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่อนุญาตให้ใช้สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง และเครื่องมือสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- บ้งอร ศรีพานิชกุลชัย วรณา ศิริแสงตระกูล และ
กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย ผลของแคดเมียม
และซัลเฟตต่อระบบเอนไซม์ที่ใช้ไมตาโบไลซ์
สารแปลกปลอมของตับแฮมสเตอร์ วารสาร
วิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น (รอเผยแพร่)
- วรณา ศิริแสงตระกูล และบ้งอร ศรีพานิชกุลชัย การ
กระจายตัวของแคดเมียมในเลือดและอวัยวะของ
แฮมสเตอร์ วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น
2547; 9(2) : 40-48.
- Amoruso MA, Witz Q, Goldstein BD. Enhancement
of rat and human phagocyte superoxide anion
radical production by cadmium in vitro *Toxicol
Lett.* 1982; 10:133-8.
- Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method
for measuring the breakdown of hydrogen
peroxide by catalase. *J. Biol Chem.* 1955;
195: 133-5.
- Beyermann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene
regulation and cellular signaling in mammalian
cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;
144:247-61.
- Cadmium : ATSDR public health statement [home
page] [2000 Jun 14] available from URL:
[http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/
phs808.html](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs808.html).
- Carberg I, Mannervik B. Glutathione reductase.
Methods Enzymol 1985; 113:489-90.
- Cahill AL, Nyberg D, Ehret CF. Tissue distribution
of cadmium and metallothionein as a function
of time of day and dosage. *Environ Res* 1983;
31:54-65.
- Chengelis CP. Metabolism. In: Gad SC, Christopher
PC, eds. *Animal Models in Toxicology*.
NewYork, Marcel dekker, 1992; 331-42.
- Chokesanthaporn C. Cadmium in edible plants.
Master thesis in Forensic Science, Graduate
School, Mahidol University, 1988.
- Cohn VH, Lyle J. A fluorometric assay for
glutathione. *Anal Biochem* 1966; 14:
434-40.
- Groten JP, Bladeren PJV. Cadmium bioavailability
and health risk in food. *Trends Food Sci Tech*
1994; 5:50-5.
- Halliwel B. Free radicals, antioxidants and human
disease: curiosity, cause or consequence.
The Lancet 1994; 344: 721-4.
- Harvard Study: selenium and prostate cancer
[homepage]. [2000 May 24]. Available from
URL:[http://www.deaddoctor.com/html/
cancer.html](http://www.deaddoctor.com/html/cancer.html)
- IARC monograph 1993; 1-42:139-41.
- Kaim W, Schwederski B. (eds.) Bioinorganic
chemistry: In Inorganic elements in the
chemistry of life an introduction and guide.
West Sussex: John Wiley&Sons. LTD. 1994;
323-8.
- Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods
Enzymol* 1985; 113:490-95.
- Ognjanovic B, Zikic RV, Stajn A, Saicic ZS, Kostic
MM, Petrovic VM. The effect of selenium on
the antioxidant defense system in the liver of
rats exposed to cadmium. *Physiol Res* 1995;
44:293-300.
- Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH,
Oberley LW, Rahemtulla A, Nanji AA.
Increased lipid peroxidation and impaired
antioxidant enzyme function is associated with
pathological liver injury in experimental
alcoholic liver disease in rats fed diets high in
corn oil and fish oil. *Hepatology*. 1998;

- 27(5): 1317-23.
- Pornsuttijanya S, Jaengsawang J. Cadmium in black tiger prawn, *Penaeus monodon*, *J Med Sci* 1994; 37(2):121-6.
- Rotruck JP, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179(9): 588-90.
- Selenium : vitamin etc. [home page] [2000 Jun 28] Available from: URL: <http://www.Bookman.com.au/vitamins/selenium.html>
- Stajn S, Zikic RV, Ognjanovic B, Saicic IS, Pavlovic SZ, Kostic MM, Petrovic VM. Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp Biochem Physiol* 1997; 117C(2): 167-72.
- Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad Biol Med* 1995;18:321 -36.
- Suphanithasaporn B. Dietary intake of lead and cadmium of Thai adults in Ubonratchathani. Master thesis in Science, Graduate School, Mahidol University, 1995.
- Suprapan R. Dietary intake of lead and cadmium in Thai adults in Bangkok area. Master Thesis in Science, Graduate School, Mahidol University, 1991.
- Thammavit W, Moore MA, Hiaso Y, Ito N. Generation of high yields of Syrian hamster cholangiocellular carcinomas and hepatocellular nodules by combined nitrite and aminopyrine administration and *Opisthorchis viverrini* infection. *Jpn J cancer Res.* 1988; 79: 909-16.
- Viljoen AJ, Tappel AL. Interactions of selenium and cadmium with metallothionein-like and other cytosolic proteins of rat-kidney and liver *J Inorg Biochem.* 1988;34:277-90.
- Vongbuddhapitak A. Contamination of Thai food during BE 2530-2534. *J Med Sci.* 1993; 36(1):19-30.
- Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem.* 2000; 79(1-4): 241-4.
- Wahba ZZ, Coogan TP, Rhodes SW, Waalkes MP: Protective effect of selenium on cadmium toxicity in rats: role of altered toxicokinetics and metallothionein. *J Toxicol Environ Health.* 1993;38:171-82.
- Ward JR, Peters T. Free radicals. In Devlin MT (editor). *Biochemistry with clinical correlations.* 3rd Willey Liss Inc 1994; 765-75.
- WHO guidelines on development consumer information on proper use of traditional, complementary and alternative medicine. 2004, Geneva, **World Health Organization.**
- WHO monographs on selected medicinal plants. Vol 1. 1999. Geneva: **World Health Organization.**
- Włodarczyk B, Biernacki B, Minta M, Kozaczynski W, Juszkievicz T. Male golden hamster in male reproductive toxicology testing: assessment of protective activity of selenium in acute cadmium intoxication. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995; 54: 907-12.
- Zhong Z, Troll W, Koenig KL, Frenkel K. Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 1990; 20:7564-70.