บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ตะกั่ว (Lead)

ตะกั่วเป็นโลหะที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น ในอุตสาหกรรมแบตเตอรี่ เป็นส่วนผสมของน้ำมัน อุตสาหกรรมสี วัสดุเซรามิค ตลอดจนยาฆ่าแมลง (Winship, 1989) อย่างไรก็ตาม หากใช้ไม่ถูกวิธีหรือควบคุมไม่ถูกต้อง ตะกั่วก็อาจเกิดพิษต่อร่างกายได้ ปัจจุบันสามารถพบตะกั่วได้ในสภาพแวดล้อมและในระบบชีวภาพทั่วไป (Goyer, 1996) กระบวนการอุตสาหกรรมทำให้คนงานข้างต้นมีโอกาสที่สัมผัส และเสี่ยงต่อการเป็นโรคเนื่องจากพิษตะกั่วได้สูงกว่าคนทั่วไป

ในประเทศไทยมีรายงานว่า สารตะกั่วเป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของโรคภัยไข้เจ็บที่เกิดจากการปฏิบัติงานในโรงงานแบตเตอรี่ การจราจรที่แออัดเพิ่มอัตราการหายใจเอาตะกั่วเข้าสู่ร่างกาย ตะกั่วเข้าสู่ร่างกายได้ทางการหายใจและทางอาหาร แล้วดูดซึมผ่านเข้าทางเดินอาหาร การดูดซึมนี้ในเด็กสูงกว่าผู้ใหญ่มาก ตะกั่วอินทรีย์ เช่นtetraethyl lead ยังดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้อีกด้วย (Winship, 1989) เมื่อเข้าสู่ร่างกาย ตะกั่วจะทำให้เกิดอาการของโรคพิษตะกั่วได้ 2 แบบ คือ แบบเฉียบพลัน (acute poisoning) มักเกิดเนื่องจากการกินสารละลายตะกั่วความเข้มข้นสูงโดยอุบัติเหตุ จะมีอาการรุนแรงจนถึงแก่ความตายได้หากรักษาไม่ทัน และแบบเรื้อรัง (chronic poisoning) เกิดเนื่องจากการสะสมตะกั่วเข้าสู่ร่างกายทีละน้อย อาจโดยการหายใจ การกินหรือดูดซึมทางผิวหนัง อาการที่พบบ่อย คือ อาการโลหิตจาง(anemia) ไตถูกทำลาย อาการทางระบบประสาทส่วนกลางถูกรบกวนจนถึงถูกทำลาย (Winship, 1989)

ในทางชีวเคมีได้มีผู้ศึกษาผลของตะกั่วต่อระบบโลหิต พบว่าตะกั่วสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ฮีม โดยยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดในกระบวนการนี้ เช่น heme synthetase, delta-aminolaevulinic acid dehydratase (δ-ALA) และ ferrochelatase เป็นต้น อันนำไปสู่ภาวะโลหิตจางในที่สุด (Goyer, 1996) สำหรับระบบประสาทส่วนกลาง พบว่าการสะสมของตะกั่วสูงที่สุดที่ gray matter ผู้ป่วยเกิดอาการ encephalopathy เสียการทรงตัวและสติสัมปชัญญะรุนแรงจนถึงตายในที่สุด

จากข้อสังเกตที่ว่าตะกั่วสามารถออกฤทธิ์ได้ต่อหลายอวัยวะในร่างกาย จึงตั้งสมมติฐานว่า การขนส่งตะกั่วในกระแสโลหิตอาจเป็นกระบวนการสำคัญในการเกิดโรคพิษตะกั่วในอวัยวะต่างๆ จากรายงานของสุพิชชา (1994) มีโปรตีนในกระแสโลหิตอย่างน้อย 2 ชนิดที่จับตะกั่วได้ และตัวหนึ่งในนั้นคือเซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) ซึ่งที่ทำหน้าที่ขนส่งทองแดง ยิ่งกว่านั้น สุพิชชา (1994) ยังพบว่าโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมินที่นำมาจากซีรัมคนไข้โรคพิษตะกั่วมีตะกั่วจับอยู่ด้วย ทำให้สรุปได้ว่าเมื่อตะกั่วเข้าสู่ร่างกายเซอรูโลพลาสมินอาจทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งตะกั่วไปยังอวัยวะต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ระดับความเข้มข้นของตะกั่วต่ำสุดที่มีผลต่อร่างกายที่อวัยวะต่างๆ (Goyer, 1996)

ผลต่อร่างกาย	ความเข้มข้นของตะกั่วในเลือด (µg/dl)	
	ในเด็ก	ในผู้ใหญ่
สมอง		
Encephalopathy (overt)	80-100	100-112
Hearing deficit	20	
IQ deficits	10-15	-
In vivo effects	10-15	-
Peripheral neuropathy	40	40
ระบบเลือด		
โลหิตจาง	80-100	80-100
U-ALA	40	40
B-EPP	15	15
ยับยั้งการสร้าง ALAD	10	10
ยับยั้งการสร้าง Py-5-N	10	-
ไต		
Nepharopathy (ไตวาย)	40	
Vitamin D metabolism	< 30	
ความดันโลหิต (ผู้ชาย)	-	30
ระบบสืบพันธุ์		40

U-ALA = Urine aminolaevulinic acid
EPP = Erythrocyte protoporphyrin
ALAD = Aminolaevulinic acid dehydratase
Py-5-N = pyrimidine-5-nucleosidase

การที่ตะกั่วลดการสังเคราะห์ฮีมโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด (Goyer, 1996) ได้แก่ delta-aminolaevulinic acid synthetase, delta-aminolaevulinic acid dehydratase และ ferrochelatase จึงมีผลทำให้การสร้างเม็ดเลือดแดงลดลงจนนำไปสู่ภาวะโลหิตจาง เซอรูโลพลาสมินที่เร่งปฏิกิริยานำเหล็กในรูป ferric ion เข้าจับกับทรานสเฟอร์ริน (โปรตีนขนส่งเหล็กในเลือด) เพื่อนำเหล็กเข้าสู่โมเลกุลของฮีม ซึ่งเซอรูโลพลาสมินจะเปลี่ยนเหล็กจากอาหารซึ่งอยู่ในรูป ferrous ion โดยมี ferroxidase activity เปลี่ยนเหล็กให้อยู่ในรูป ferric ion ซึ่งมีรูปแบบสมการดังนี้

$$Fe^{2+} + O_2 + \text{Ceruloplasmin-}Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + H_2O + \text{Ceruloplasmin-}Cu^{1+}$$

2. เซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin)

2.1 สรีรวิทยาและหน้าที่ของเซอรูโลพลาสมิน

เซอรูโลพลาสมิน เป็นไกลโคโปรตีนที่สังเคราะห์จากตับ มีคาร์โบไฮเดรท 7% น้ำหนักโมเลกุล 132,000 ดาลตัน ในแต่ละโมเลกุลมีทองแดงอยู่ 6-7 อะตอม เมื่อทองแดงรวมกับอะโป-เซอรูโลพลาสมินซึ่งเป็นโปรตีนไม่มีสีจะได้เป็นโฮโลเซอรูโพลาสมินที่มีสีน้ำเงินและทำหน้าที่ต่อไปนี้ (Saenko *et al.*,1994)

2.1.1 มี ferroxidase activity ทำหน้าที่เปลี่ยน Fe(II)→Fe(III) ให้จับกับทรานสเฟอร์รินในการขนส่งเหล็กต่อไป

2.1.2 ด้วยปฏิกิริยา ferroxidase activity เซอรูโลพลาสมินจะสามารถนำเหล็กอิสระจากพลาสมาไปจับกับเฟอร์ริติน (โปรตีนในตับที่ทำหน้าที่จับเหล็ก) เป็นการรักษาระดับเหล็กในเลือดและป้องกันการเกิด lipid peroxidation บนเยื่อเซลล์ ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) จากเซลล์เม็ดเลือดขาว และ macrophage ในสภาวะที่มีการอักเสบจึงจัดเป็น acute phase reactant

2.1.3 ทำหน้าที่ขนส่งทองแดงไปยังอวัยวะต่างๆ ที่มี receptor ของเซอรูโลพลาสมิน

2.1.4 ควบคุมระดับ amine ในร่างกายด้วยปฏิกิริยา amine oxidase activity เช่น ในพลาสมา สมอง spinal fluid และ interstitial fluid

2.1.5 เนื่องจากเซอรูโลพลาสมินมี homology sequence กับ blood clotting factors V และ VIII จึงจับกับ platelet มีส่วนควบคุมและช่วยในขบวนการแข็งตัวของเลือดด้วย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

90% ของทองแดงในพลาสมาจับอยู่กับเซอรูโลพลาสมิน ที่เหลืออีก 10% จะจับกับแอลบูมินหรือกรดอะมิโนบางตัวอย่างหลวม การที่เซอรูโลพลาสมินจับแน่นกับทองแดงจะช่วยป้องกันพิษจากการมีทองแดงอิสระมากเกินไปจนไปสะสมที่อวัยวะต่างๆ แต่เซอรูโลพลาสมินจะพาทองแดงไปที่ตับเพื่อให้เซลล์ตับเก็บไว้ จากนั้นตับจะขับทองแดงออกทางน้ำดี

เซอรูโลพลาสมินในพลาสมาคนปกติมีค่า 20-50 มก./มล. เด็กเกิดใหม่จะมีค่าต่ำราว 1 ใน 3 ของผู้ใหญ่ แต่ระดับนี้จะเพิ่มขึ้นจนเท่ากันภายหลังอายุ 1 ปีแล้ว ในบางภาวะจะมีค่าในพลาสมาสูงขึ้น เช่น ขณะตั้งครรภ์ มีการอักเสบหรือติดเชื้อต่าง ๆ หรือโรคมะเร็งบางชนิด

ปริมาณเซอรูโลพลาสมินที่ลดต่ำลงมีความสำคัญมากในการวินิจฉัย Wilson's disease (hepatolenticular degeneration) ซึ่งเป็นโรคทางกรรมพันธุ์ที่แม้จะพบยาก อุบัติการเกิด 1 : 50,000 ถึง 1 :100,000 แต่ก็พบได้ในคนไทยทั่วไป (นีโลบล, 2539) กลไกการเกิดอาจเนื่องจากเป็นความผิดปกติของเซลล์ตับที่สร้างอะโปเซอรูโลพลาสมินที่ไม่สามารถจับกับทองแดงได้ ทำให้มีทองแดงอิสระไปสะสมและทำลายอวัยวะต่างๆ เช่น ระบบประสาทโดยเฉพาะสมองส่วน lenticular nucleus ของ basal ganglia และการสะสมในเซลล์ตับจนเสื่อมหน้าที่ ลักษณะจำเพาะของผู้ป่วยโรคนี้คือ Kayser-Fleischer ring เป็นวงแหวนสีน้ำตาลรอบตาดำ เนื่องจากมีการสะสมของทองแดงที่บริเวณ descemet membrane ของกระจกตา ยีนที่เกี่ยวข้องอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 และโรค Menkes ซึ่งเป็นความผิดปกติของยีน X-linked ทำให้เกิดผิดปกติของ copper metabolism ทำลายสีผมและระบบประสาทเสื่อม

2.2 โครงสร้างของเซอรูโลพลาสมิน

2.2.1 โครงสร้าง 3 มิติของเซอรูโลพลาสมิน

เซอรูโลพลาสมินเป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 1046 ตัว การศึกษาโดยใช้ X-ray crystallography (Zaitseva *et al.*,1996; 1999) สามารถอธิบายได้ว่าเซอรูโลพลาสมินประกอบด้วยทองแดง 6 อะตอมที่อยู่ตำแหน่งต่างๆ กันในโมเลกุล และจับกับกรดอะมิโนในลักษณะต่างกัน เราสามารถจำแนกลักษณะการจับของทองแดงกับกรดอะมิโนในโปรตีนออกได้เป็น 3 ประเภท (Malstrom, 1982) ดังแสดงในตารางที่ 2

ในโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมิน มีทองแดงในลักษณะข้างต้นอยู่ 3 ประเภท กล่าวคือ

ประเภทที่ 1 (blue-copper center) มีทองแดงฝังอยู่ใน domain 2, 4 และ 6 แต่ละ domain มีทองแดงอยู่ 1 อะตอม และใช้กรดอะมิโนที่จับกับทองแดงแตกต่างกันดังนี้

domain 2- His_{276}, His_{324}, Cys_{319}

domain 4- His_{637}, His_{685}, Cys_{680}, Met_{690} และ

domain 6- His_{725}, His_{1026}, Cys_{1021}, Met_{1031}

ทองแดงทั้ง 3 อะตอมเกี่ยวข้องโดยตรงกับออกซิเดส แอคติวิตี

ลักษณะการจับทองแดงประเภทที่ 2 และ 3 ต่อไปนี้อยู่บริเวณรอยสัมผัส (interface) ของ domain 1 และ 6 และมีความสัมพันธ์กันอย่างยิ่ง เรียกรวมกันว่าเป็นtrinuclear site โดยมี

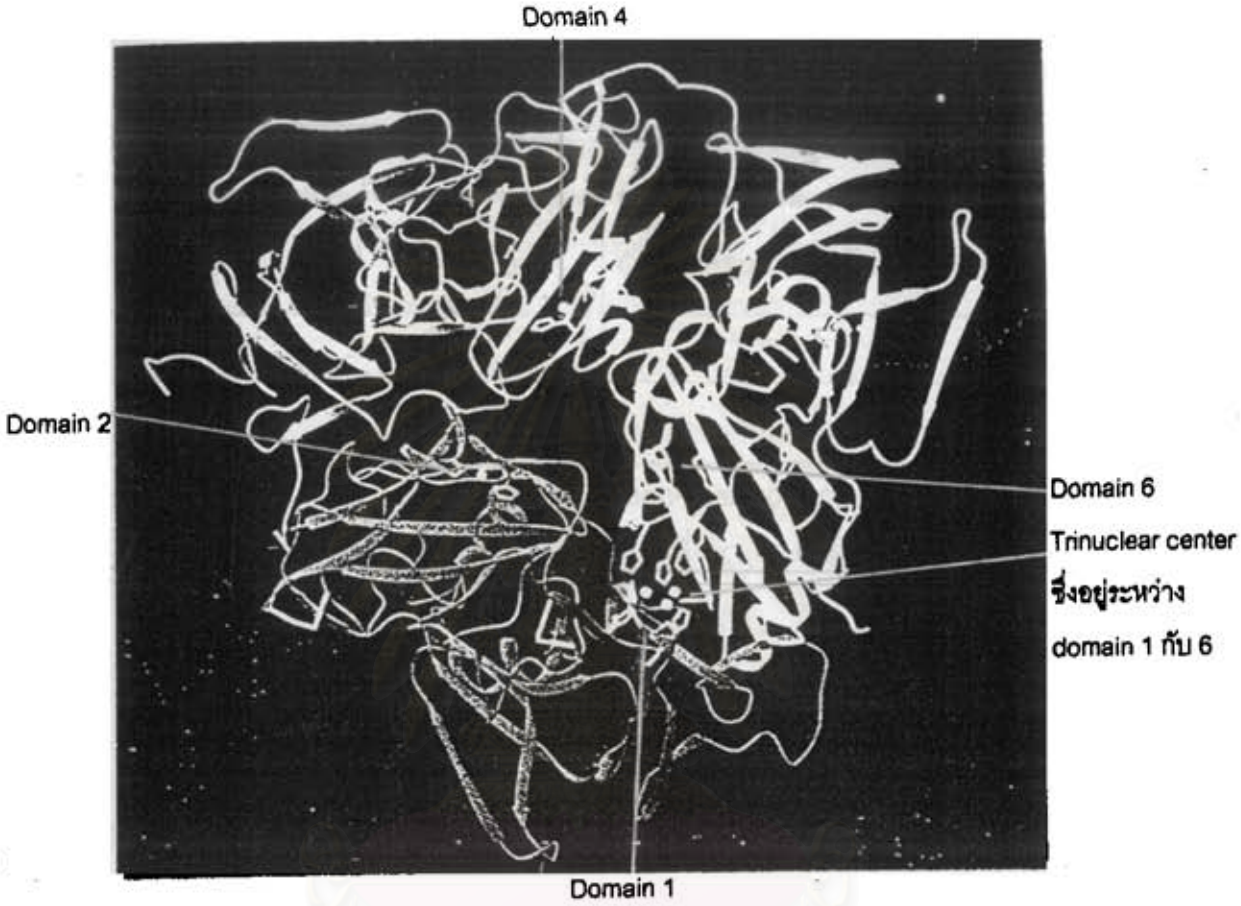
ประเภทที่ 2 ใช้ His_{101} และ His_{978} จับกับทองแดง 1 อะตอม

ประเภทที่ 3 ใช้ His_{103}, His_{161}, His_{1022} จับกับทองแดง 1 อะตอม และใช้ His_{163}, His_{980}, His_{1020} จับกับทองแดงอีก 1 อะตอม

การจับกับทองแดง 2 ประเภทหลังนี้เป็นการช่วยเหลือกันในลักษณะ charge-relay system ทำให้ความสามารถในการจับกับทองแดงได้แน่นมาก

นอกจากนี้ใกล้กับ domain 4 และ 6 จะมีตำแหน่งที่จับกับโลหะได้แต่ไม่มั่นคงนัก เรียกว่า labile site อยู่ 2 ตำแหน่ง (Lindley *et al.*, 1997) คาดว่าใช้หมู่โซ่ข้างของ acidic amino acid ในการจับกับทองแดง ตำแหน่งแรกอยู่ใกล้ domain 6 มีทองแดงอยู่ 1 อะตอม ประกอบด้วย His_{960}, Glu_{935}, Asp_{1025} จาก domain 6 และ Asp_{272} จาก domain 2 labile site ตำแหน่งที่ 2 อยู่ใกล้กับ domain 4 ประกอบด้วย His_{602}, Glu_{597}, Asp_{684} จาก domain 4 และ Glu_{971} จาก domain 6 (รูปที่ 3) และเนื่องจาก steric effect จึงทำให้ตำแหน่งสุดท้ายนี้ไม่สามารถจับกับทองแดงได้ แต่อาจจับกับโลหะที่มีขนาดเล็กกว่า รวมจำนวนทองแดงในเซอรูโลพลาสมินจึงมีเพียง 7 อะตอม

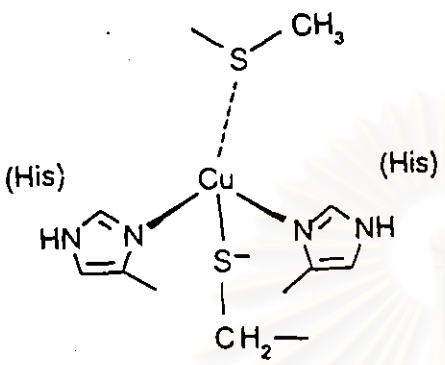
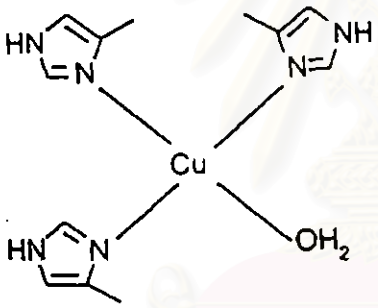
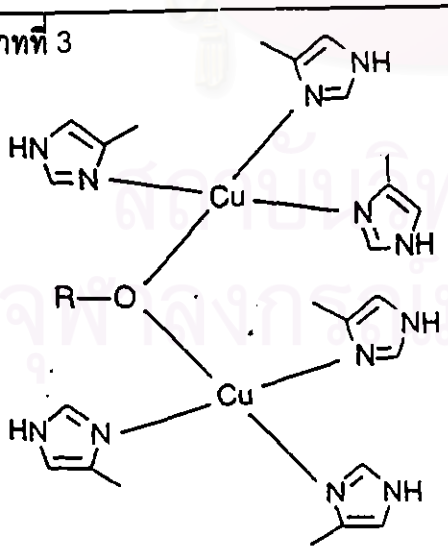
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

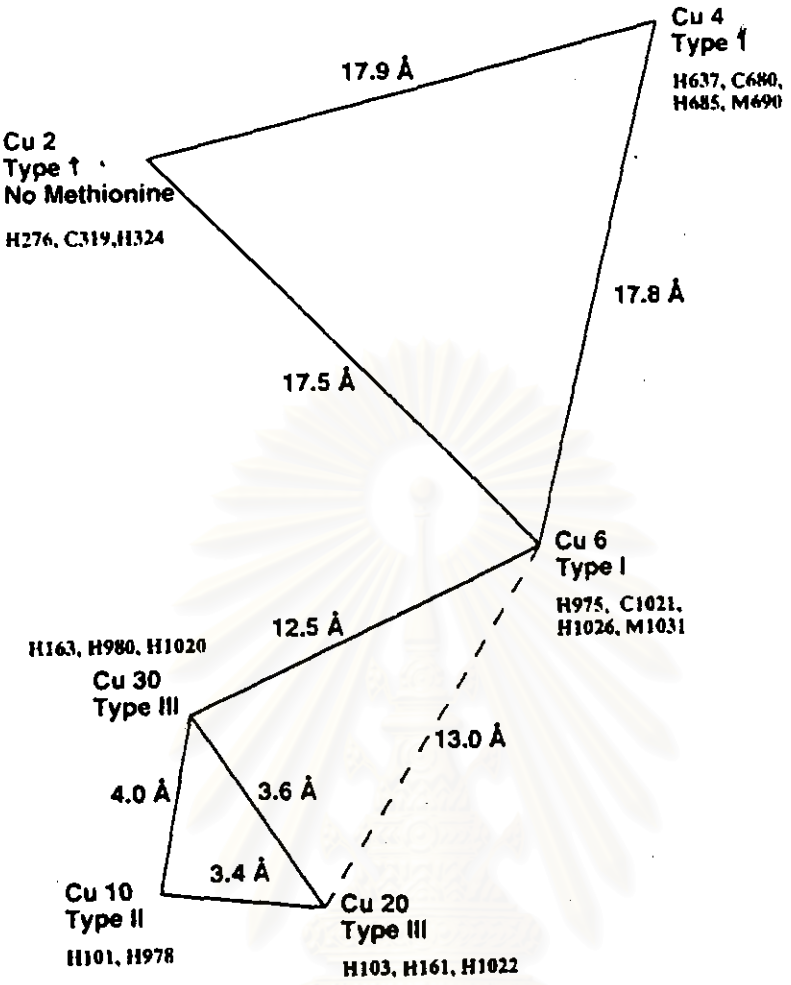


รูปที่ 1 โมเลกุลเซอรูโลพลาสมินแสดงลักษณะของ domain ทั้ง 6 ใน β-barrel ของเซอรูโลพลาสมิน (Zaitseva *et al.*,1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

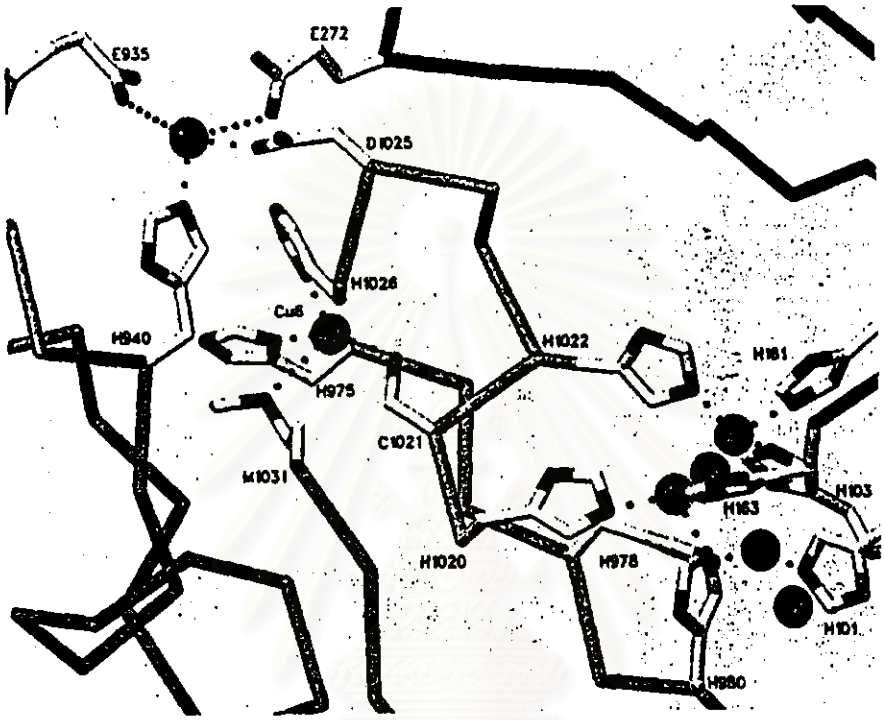
ตารางที่ 2 ลักษณะการจับของทองแดงกับกรดอะมิโนในโปรตีน (Malström, 1982)

โครงสร้าง	หน้าที่ โครงสร้างและสมบัติ
ประเภทที่ 1 (Met)  (Cys⁻)	'blue' copper centers หน้าที่ reversible electron transfer $Cu^{II} + e^- \rightleftharpoons Cu^{I}$ โครงสร้าง: เป็น (3+1) coordination และทองแดง Cu (II) ดูดกลืนแสงที่ 600 nm $\varepsilon > 2000\ M^{-1}cm^{-1}$
ประเภทที่ 2 	'non-blue' copper หน้าที่: O_2 activation โดย Cu(I) ในการจับorganic coenzyme โครงสร้าง: planar ด้วย coordination (Jahn-Teller effect for Cu^{II}) Cu^{II} ดูดกลืนแสงที่ 350 nm และ 600 nm ได้ต่ำ $\varepsilon < 1000\ M^{-1}cm^{-1}$ ให้สัญญาณใน EPR
ประเภทที่ 3 	copper dimer หน้าที่: O_2 uptake from the Cu^{I}-Cu^{I} state โครงสร้าง: (bridged) dimer ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเกิด O_2 uptake ค่าดูดกลืนแสงที่ 350 nm และ 600 nm เพิ่ม, ε= 20000 and 1000 $M^{-1}cm^{-1}$ แต่ EPR inactive



รูปที่ 2 ระยะระหว่างทองแดงในแต่ละ domain ในเซอรูโลพลาสมิน โดยแบ่งทองแดงเป็น 3 ประเภทตามลักษณะการจับกับโปรตีนตามการแบ่งของ Malström (1982)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 บริเวณlabile site ของ metal cation ในโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมิน (Lindley *et al.*, 1997)

a เป็นการเข้าจับของโคบอลท์ (Co) ซึ่งจับกับ labile site ใกล้ domain 6 เพียง 1 site

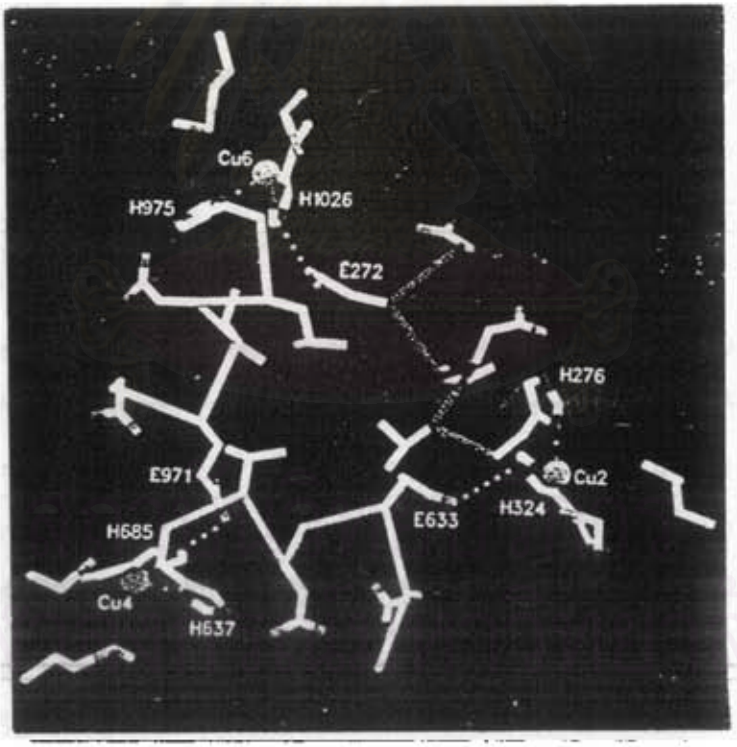
b เป็นการเข้าจับของเหล็ก (Fe) ซึ่งจับกับทั้ง 2 labile site ใกล้ domain 4, 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของออกซิเดส

(Lindley *et al.*, 1997; Zaitsev *et al.*, 1999)

Lindley และ Zaitsev อธิบายถึงกลไกการเกิด ferroxidase activity ซึ่งเริ่มจาก Fe^{2+} จะจับที่ labile site ทั้ง 2 ที่ domain 4 และ 6 อิเล็กตรอนจาก Fe^{2+} จะถูกส่งผ่านมายังทองแดงประเภทที่ 1 ใน domain 4, 6 โดยทองแดงชนิดที่ 1 ใน domain 6 จะส่งผ่านอิเล็กตรอนแล้วผ่าน Cystein-Histidine linkage ไปยัง trinuclear center โดยตรง ส่วนทองแดงชนิดที่ 1 ใน domain 4 นี้จะส่งผ่านอิเล็กตรอนไปตามทางเชื่อมระหว่าง domain 4 และ domain 6 ไปยัง trinuclear center ซึ่งการส่งผ่านอิเล็กตรอนใน domain 4 นี้จะเกิดขึ้นช้ากว่าอิเล็กตรอนที่ผ่านทาง domain 6 มากเนื่องจากค่า relative redox potential ของทองแดงชนิดที่ 1 ใน domian 6 สูงกว่า domain 4 ถึง 100 mV (ค่า redox potential ประมาณ 200 mV) จึงคาดว่า domain 4 จะเป็นตำแหน่งให้สับสเตรทอยู่ ดังนั้น rate limiting step ของปฏิกิริยานี้อยู่ที่การเกิด potential-driven diffusion ของเหล็ก



รูปที่ 4 บริเวณที่ทองแดงประเภทที่ 1 ที่จับกับเซอรูโลพลาสมินใน domain 2, 4 และ 6 (Lindley *et al.*, 1997)

ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการจับโลหะกับเซอรูโลพลาสมิน จำเป็นต้องศึกษากับอะโปเซอรูโลพลาสมิน ซึ่งเตรียมได้จากการใช้สารจับโลหะ(metal chelators) ดึงทองแดงออกจากโมเลกุลของโฮโลเซอรูโลพลาสมิน

3. **สารจับโลหะ** (Metal chelators)

Chelators เป็นสารจับโลหะที่มีประจุหรือไม่มีประจุก็ได้ แต่สามารถให้อิเล็กตรอน (electron) ได้แล้ว เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะ (metal ion complex) หมู่เคมีที่จำเป็นในการจับโลหะออกจากชีวโมเลกุล ได้แก่ O-, S- หรือ N- ซึ่งมักอยู่ในรูป -OH, -COOH, >C=O, -S-S-, $-NH_2$ เป็นต้น

สารจับโลหะข้างต้นได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคพิษอันเกิดจากโลหะ ยาข้างต้นมีความจำเพาะต่อโลหะแตกต่างกันบ้าง คุณสมบัติพื้นฐานที่ใช้ในการพิจารณาเพื่อสังเคราะห์ยาข้างต้นได้แก่ ความสามารถในการละลายน้ำ ความทนทานต่อการถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกาย ความสามารถที่จะเข้าสู่ตำแหน่งหรืออวัยวะที่สะสมโลหะนั้นๆ ได้ ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาเป็นสารเชิงซ้อนกับโลหะ สารนี้ควรมีสัมพรรคภาพ (affinity) ต่ำต่อโลหะจำเป็นเช่น Ca, Zn และสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นต้องถูกขับออกจากร่างกายได้ดี (Jone, 1992; Goyer, 1996)

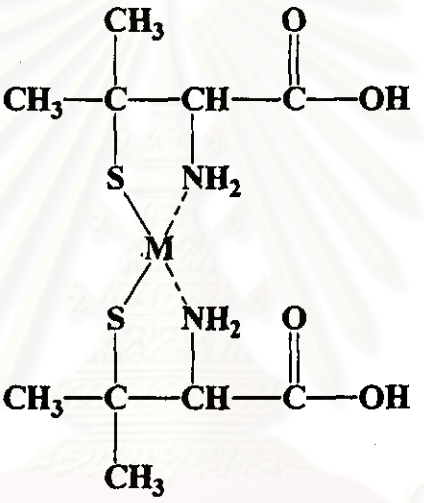
ตัวอย่างสารจับโลหะที่ใช้ได้แก่ DMPS (2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid), EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid), Penicillamine และ DTC (diethyldithio-carbamate) ซึ่งมีสมบัติต่อไปนี้

1. Penicillamine (β,β′-dimethylcystein) เป็นสารที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) เพนนิซิลิน ใช้รักษาโรคพิษตะกั่ว Wilson's disease สารนี้เร่งการขับถ่ายตะกั่ว ปรอท และเหล็ก แต่ก็สามารถเร่งการขับถ่ายโลหะที่จำเป็นต่อร่างกายด้วยเช่น สังกะสี โคบอลท์ และแมงกานีส อาจทำให้เกิดการแพ้ เช่นเกิดผื่นที่ผิวหนัง การผิดปกติที่ไตโดยมีโปรตีนปนมาในปัสสาวะไม่ควรใช้กับคนไข้ที่แพ้เพนนิซิลิน (Walshe, 1983)

2. Calcium-EDTA เป็น calcium disodium salts ของ ethylendiaminetetra acetic acid สารนี้จับกับตะกั่วโดยตะกั่วจะแทนที่แคลเซียม ใช้ในการรักษาคนไข้โรคพิษตะกั่ว การขับถ่ายตะกั่วจากเนื้อเยื่อจะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง ส่วนการเอาตะกั่วออกจากกระดูกเกิดขึ้นช้ากว่า สารจับโลหะชนิดนี้เป็น hexadentate ligand ซึ่งประกอบด้วยออกซิเจน 4 อะตอม และไนโตรเจน 2 อะตอมทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ใน pH มากกว่า 12 หมู่คาร์บอกซิลิกทั้งหมดอยู่ในรูปไม่มีโปรตอน EDTA จึงสามารถจับกับโลหะเกือบทุกชนิดได้ในอัตราส่วน 1:1

3. DMPS (2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid) เป็นอนุพันธ์ที่ละลายน้ำได้ของ BAL (2,3-dimercaptopropanol) เพื่อลดการเป็นพิษและผลข้างเคียงของ BAL สารนี้ใช้หมู่เคมี sulfur จับกับโลหะ สาร DMPS นี้ไม่ละลายในไขมันจึงเข้าเซลล์ไม่ได้ สามารถใช้ในการดึง inorganic และ methyl mercury ที่อยู่นอกเซลล์ออก สารนี้ใช้ได้ผลในการเร่งการขับถ่าย Cu Ni Cd โดยใช้ทันทีหลังจากได้รับสาร แต่ไม่สามารถเอาสารที่อยู่ในเนื้อเยื่อออก (Goyer, 1996)

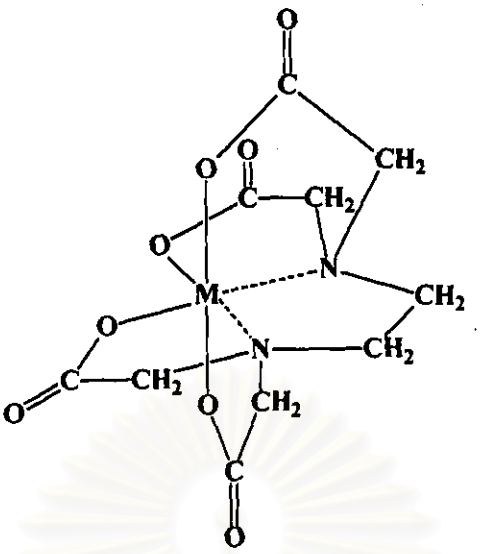
4. Dithiocarb (sodium diethyldithiocarbamate, DTC หรือ DDC) ใช้ในการรักษาพิษแบบเฉียบพลันของ Nickel carbonyl ได้ (Sunderman, 1979)



รูปที่ 5.1 Penicillamine : Metal = 2 : 1

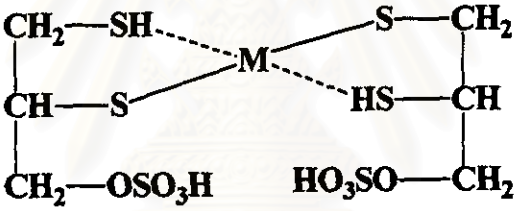
M = metal cation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



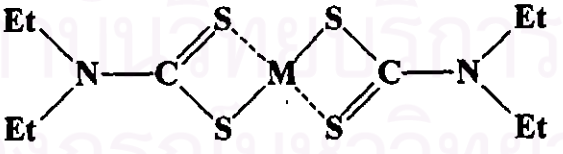
รูปที่ 5.2 EDTA : Metal = 1 : 1

M = metal cation



รูปที่ 5.3 DMPS : Metal = 2 : 1

M = metal cation



รูปที่ 5.4 DTC : Metal = 2 : 1

Et = ethyl group

M = metal cation

รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารจับโลหะทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Penicillamine, EDTA, DMPS และ DTC กับโลหะ (metal cation) ในรูป 5.1, 5.2, 5.3 และ 5.4 ตามลำดับ

4. จลนพลศาสตร์ของการเข้าจับ (Kinetics of Binding)

การจับของลิแกนด์ (ligand หรือโมเลกุลขนาดเล็ก) หรืออิออน (ion) กับโปรตีน (protein หรือ macromolecule) จะมีลักษณะคล้ายกับการจับของเอนไซม์กับสับสเตรท (substrate) เช่น การจับของออกซิเจนกับฮีโมโกลบิน และบริเวณที่ลิแกนด์เข้าจับกับโปรตีนเรียกว่า binding site ขบวนการที่ลิแกนด์เข้าจับโปรตีนมีหลายรูปแบบดังนี้

1. แบบ noncooperative binding การเข้าจับของลิแกนด์กับโปรตีน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformation) ของโปรตีน ลิแกนด์ที่เข้าจับแต่ละตัวเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการของการเข้าจับได้ดังนี้

$$P + A \rightleftharpoons PA$$

$$k = \frac{[PA]}{[P][A]} \quad \cdots \cdots \cdots \cdots \quad (1)$$

เมื่อ k = ค่าคงที่ของการเข้าจับ (binding constant หรือ association constant)
หรือสามารถเขียนในเชิงของการแตกตัว ดังนี้

$$K_d = \frac{[P][A]}{[PA]} \quad \cdots \cdots \cdots \cdots \quad (2)$$

K_d = ค่าคงที่ของการแตกตัว (dissociation constant) ซึ่งเป็นส่วนกลับของค่า k

ถ้า ν = แทนค่าเฉลี่ยของลิแกนด์ที่จับกับโปรตีนต่อโปรตีนนั้น

[PA] = จำนวนโมลของลิแกนด์ที่จับกับโปรตีน

ดังนั้น จำนวนโมลของโปรตีนทั้งหมด = ([P]+[PA])

$$\nu = \frac{[PA]}{[P] + [PA]} \quad \cdots \cdots \cdots \cdots \quad (3)$$

แทนค่า [PA] = k[P][A]

$$\nu = \frac{k[P][A]}{[P] + k[P][A]} = \frac{k[A]}{1 + k[A]} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots (4)$$

ซึ่งเป็นค่าสำหรับจำนวน 1 site

ถ้า n = จำนวน site ทั้งหมดของโปรตีน

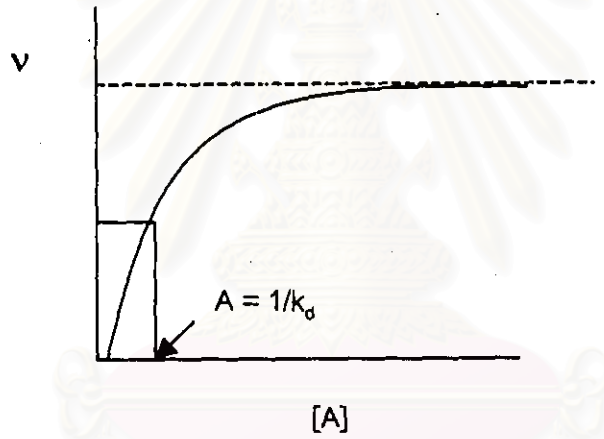
เมื่อแทนค่าในสมการ (4) และจัดรูปแบบใหม่

$$\nu = \frac{nk\,[A](1 + k[A])^{n-1}}{(1 + k[A])^{n}}$$

$$\nu = \frac{nk\,[A]}{(1 + k[A])} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (5)$$

เมื่อนำค่า ν กับ [A] มาเขียนกราฟจะได้กราฟรูปไฮเพอร์โบลา ถ้า $\nu \rightarrow 0$ (saturation)

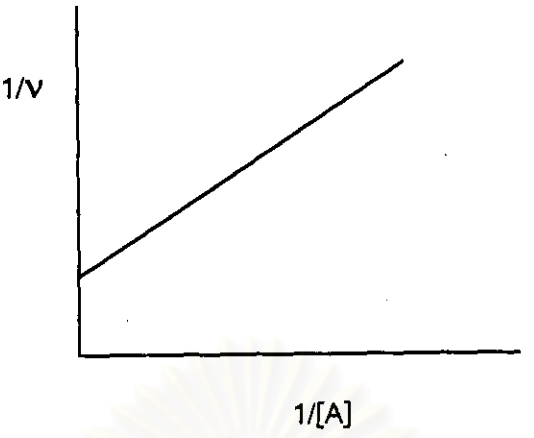
ดังนั้น $[A] \rightarrow \infty$ ดังนั้นที่ half saturaton ($\nu_{0.5}$) จะได้ $[A] = 1/k$ หรือ K_d



หรือเขียนในรูปเขียนแบบDouble reciprocal plot

$$\frac{1}{\nu} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk\,[A]} \ldots\ldots\ldots\ldots (6)$$

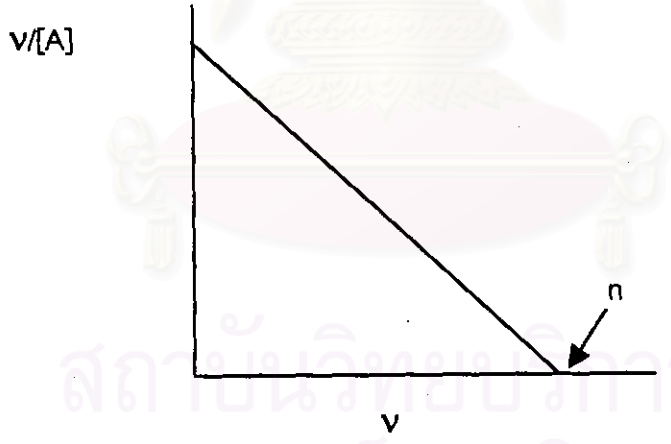
เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $1/\nu$ กับ $1/[A]$ จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งมี intercept ที่แกน $1/\nu = 1/n$ และค่า slope = $1/nk$



ถ้านำมาเขียนในรูปของสมการใหม่ในแบบ Scatchard plot

$$\frac{\nu}{[A]} = nk - \nu k \cdots \cdots \cdots \cdots (7)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง ν/[A] กับ ν จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งมี intercept บนแกน ν = n และค่า slope = -k หรือ $1/K_d$



2. แบบ cooperative binding ถ้าการเข้าจับของลิแกนด์กับโปรตีนมีผลทำให้โครงสร้าง (conformation) เปลี่ยนไป ซึ่งจะมีผลต่อการจับของลิแกนด์ตัวต่อไป ถ้ามีผลทำให้ลิแกนด์ตัวต่อไปเข้าจับกับเอนไซม์ดีขึ้นเรียกว่า positive cooperative binding แต่ถ้ามีผลทำให้ลิแกนด์ตัวต่อไปเข้าจับได้ลดลงเรียกว่า negative cooperative binding เขียนเป็นรูปสมการดังนี้

$$\nu = \frac{n[PA_n]}{[P] + [PA]}$$

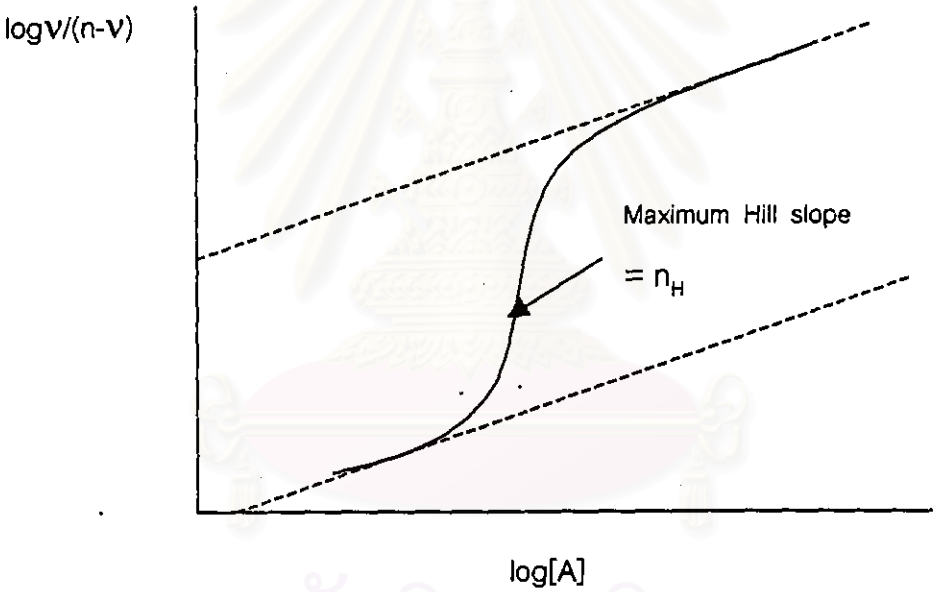
หรือ

$$\nu = \frac{nK_n[A]^n}{1 + K_n[A]^n}$$

เมื่อใส่ log เขียนอธิบายในรูปแบบของสมการ Hill plot

เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่าง log $\nu/(n-\nu)$ กับ log[A] จะได้กราฟดังรูป

$$\log \frac{\nu}{n-\nu} = \log K_n + n \log[A] \cdots\cdots\cdots\cdots (8)$$



ซึ่งสมการ Hill plot สามารถใช้อธิบายการเข้าจับว่าเป็นชนิดใด

1. ถ้ากราฟที่ได้เป็นเส้นตรง มีค่า slope เป็นค่าเดียวตลอดเส้นกราฟ แสดงการเข้าจับเป็นแบบ noncooperative และทุก site เหมือนกัน

2. ถ้ากราฟที่ได้เป็นเส้นโค้งที่มี slope มากกว่า 1 แสดงว่าการเข้าจับเป็นแบบ positive cooperativity

3. ถ้ากราฟที่ได้เป็นเส้นโค้งที่มีค่า slope น้อยกว่า 1 แสดงว่าการเข้าจับเป็นแบบ negative cooperativity

จากการที่พบว่าตะกั่วสามารถจับกับเซอรูโลพลาสมินได้ จึงเป็นที่สนใจว่าการจับระหว่างเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่วและทองแดงต่อเซอรูโลพลาสมินมีความสัมพันธ์กันหรือไม่อย่างไร และการศึกษาทางจลนพลศาสตร์อาจช่วยอธิบายความสัมพันธ์ข้างต้นได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

ศึกษาการจับระหว่างเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว

ขั้นตอนของงานวิจัย

1. เตรียมอะโปเซอรูโลพลาสมิน

   1.1 ศึกษาผลของสารจับโลหะในการดึงทองแดงออกจากเซอรูโลพลาสมิน ติดตามปริมาณทองแดง และออกซิเดส แอคติวิตี

   1.2 ยืนยันการดึงทองแดงออกโดยติดตามการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง และยูเรียพอลิอะคริลาไมด์เจล

   1.3 ศึกษาสภาพอะโปเซอรูโลพลาสมินที่ได้โดยการเติมทองแดงกลับเข้าสู่โมเลกุลของอะโป-เซอรูโลพลาสมินที่เตรียมขึ้น

2. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับทองแดงและตะกั่ว เปรียบเทียบการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินและโฮโลเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงบทบาทของทองแดงและตะกั่วในเชิงจลนพลศาสตร์กับเซอรูโลพลาสมินและอะโปเซอรูโลพลาสมิน เพื่อเพิ่มความเข้าใจการจับของตะกั่วกับเซอรูโลพลาสมิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย