

Thesis Title Bone Metabolic Abnormality and Anemia Prevalence in Thai

Population Exposed to Environmental Cadmium

Author Mr. Kowit Nambunmee

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Werawan Ruangyuttikarn Advisor

Assoc. Prof. Dr. Muneko Nishijo Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Samlee Mankhetkorn Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Yuttana Mundeet Co-advisor

ABSTRACT

Residents of the Mae Sot district, Tak province in Thailand are exposed to high levels of cadmium, a toxic metal that is concentrated in the soil and rice in this region. We hypothesized that chronic cadmium exposure was a risk factor for accelerated bone resorption, anemia, and renal tubular dysfunction. We assayed blood and urinary cadmium levels in addition to biomarkers of bone metabolism, renal tubular dysfunction, and anemia in 700 subjects with a history of elevated urinary cadmium. We also performed in vitro studies using the human fetal osteoblast like

cell line to determine if cadmium exposure impacted the mRNA expression of osteocalcin, bone alkaline phosphatase, type I collagen (Coll1A1), receptor activator for nuclear factor κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). Gene expression was determined by using reverse transcription-real time polymerase chain reaction after treatment of the cells with cadmium chloride solution.

The study subject included 261 men and 439 women. The average levels of blood cadmium were, 6.71 ± 1.84 $\mu\text{g/l}$ in men and 4.94 ± 2.02 $\mu\text{g/l}$ in women, which is higher than reported cadmium levels from a normal Thai population (0.45-2.11 $\mu\text{g/l}$). Furthermore, urinary cadmium levels were 3 times higher than the safe level of 2 $\mu\text{g/g}$ creatinine (Cr), established by the World Health Organization. Farmers had higher levels of blood and urinary cadmium than those of other occupations.

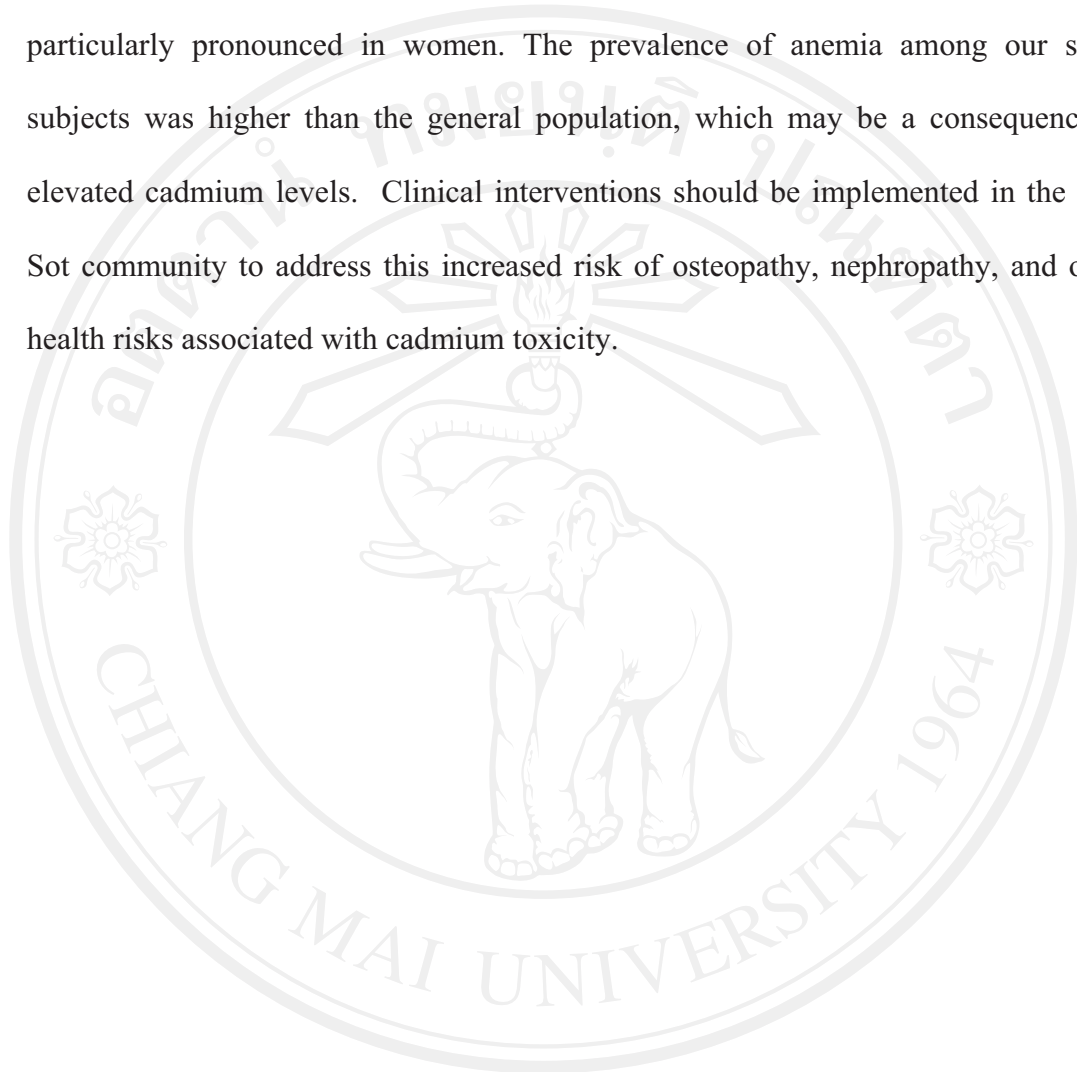
To determine if an association exists between cadmium exposure and bone metabolism, we measured the bone resorption markers, urinary deoxypyridinoline (DPD) and type I collagen crosslinked N-telopeptide (NTx), in subjects >50 years old (men=156, women=256). Both DPD (5.22 ± 1.39 nmol/mmol Cr in men; 8.30 ± 1.44 nmol/mmol Cr in women) and NTx (43.50 ± 1.80 nmol/mmol in men; 65.16 ± 1.77 nmol/mmol in women) were directly associated with cadmium concentration and the ratio of excreted calcium. The concentrations of bone resorption markers in women were higher than the bone fracture risk cutoff values previously proposed (*viz*, DPD >7.6 nmol/mmol Cr and NTx >54.3 nmol BCE/mmol Cr). Multivariate regression analysis indicated that bone resorption was accelerated by impaired calcium reabsorption in renal tubules, especially among subjects with high urinary cadmium excretion >10 $\mu\text{g/g}$ Cr.

The subjects also had high levels of the renal dysfunction markers, β_2 -microglobulin (β_2 -MG = 237.14 ± 7.43 $\mu\text{g/g Cr}$; reported normal levels = 156 ± 3.10 $\mu\text{g/g Cr}$) but not N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG = 5.52 ± 1.86 unit/g Cr; reported normal levels = 4.40 ± 1.90 unit/g Cr) and serum cystatin C (1.09 ± 1.36 mg/l; reported normal level < 1.4 mg/l). Urinary cadmium concentrations were directly associated with renal markers of renal tubular dysfunction ($p < 0.05$).

Anemia (defined as hemoglobin < 13 g/dl in men and < 12 g/dl in women) was found in 162 subjects (60 men and 102 women). In anemic subjects, urinary cadmium (7.52 ± 2.01 $\mu\text{g/g Cr}$) was significantly higher than non-anemia subjects (6.51 ± 1.88 $\mu\text{g/g Cr}$), [$p < 0.05$]. Concentrations of β_2 -MG showed a stronger relation to an increase anemia prevalence than the NAG and cystatin C. Women with levels $> 1,000$ $\mu\text{g/g Cr}$ were 2.77 times more likely to be anemic than women with β_2 -MG levels < 400 $\mu\text{g/g Cr}$ ($p < 0.001$), whereas the probability in men was 1.61. In addition, the odds ratio of women with NAG > 8 unit/g Cr and cystatin C > 1.4 mg/l were also significantly different from the other groups ($p < 0.05$).

Expression of the mRNA of osteocalcin, Col1A1 and OPG genes of the hFOB cells were detected after treatment with a CdCl_2 solution concentration of 7.72 μM (LC20) but not the mRNA of bone alkaline phosphatase and RANKL genes. However, an expression of all detected genes need more experiments to clarify the assumption that cadmium has a direct effect to the osteoblasts which causes several genes expression as its direct mechanism of bone toxicity. The differentiating factors should be considered to achieve suitable condition for osteoblast gene expression experiment.

In conclusion, chronic cadmium exposure is associated with osteopathy and nephropathy in the Mae Sot district, Tak province of Thailand. This association is particularly pronounced in women. The prevalence of anemia among our study subjects was higher than the general population, which may be a consequence of elevated cadmium levels. Clinical interventions should be implemented in the Mae Sot community to address this increased risk of osteopathy, nephropathy, and other health risks associated with cadmium toxicity.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | | |
|--------------------------------|---|----------------------|
| ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ | ความผิดปกติของเมแทบอลิซึมของกระดูกและความชุกของโรคโลหิต | |
| | จางในประเทศไทยที่สัมผัสแคดเมียมจากสิ่งแวดล้อม | |
| ผู้เขียน | นายโกวิท นามบุญมี | |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวการแพทย์) | |
| คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | | |
| | รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์ | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| | Assoc. Prof. Dr. Muneko Nishijo | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | รองศาสตราจารย์ ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | รองศาสตราจารย์ ดร.สำริ มั่นเขตต์กรณ์ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธนา หมั่นดี | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

บทคัดย่อ

ประชากรที่อาศัยในอำเภอแม่สอด จังหวัดตากของไทย ได้รับผลกระทบจากการสัมผัสแคดเมียมซึ่งเป็นโลหะที่เป็นพิษและมีสะสมในดินและข้าวในบริเวณพื้นที่นี้เป็นปริมาณมาก สมมุติฐานของงานวิจัยนี้คือการสัมผัสแคดเมียมแบบเรื้อรังเป็นปัจจัยเสี่ยงสำหรับการเร่งการละลายของกระดูก โรคโลหิตจาง และท่อไตทำงานผิดปกติ ดังนั้นประชากรในอำเภอแม่สอด จำนวน 700 คน ที่มีประวัติตรวจพบระดับแคดเมียมในปัสสาวะสูง ได้ถูกคัดเลือกเข้าสู่งการศึกษาเพื่อตรวจหาปริมาณแคดเมียมในเลือดและปัสสาวะ ค่าบ่งชี้ทางชีวภาพของการสร้างกระดูก การ

ละลายกระดูก การทำงานผิดปกติของท่อไต และภาวะโรคโลหิตจาง เพื่อทดสอบฤทธิ์โดยตรงของ แคลเซียมต่อเซลล์(อ่อน)สร้างกระดูก ได้ทดสอบการแสดงออกของ mRNA ของยีน osteocalcin, bone alkaline phosphatase, type I collagen (Col1A1), receptor activator for nuclear factor K B ligand (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) โดยอาศัยเทคนิค reverse transcription-real time polymerase chain reaction หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแคลเซียมคลอไรด์

ประชากรที่ทำการศึกษาประกอบด้วย ชาย 261 คน และ หญิง 439 คน ผลการศึกษาพบว่า ค่าเฉลี่ยแคลเซียมในเลือดของประชากรชายคือ 6.71 ± 1.84 ไมโครกรัมต่อลิตร และหญิงคือ 4.94 ± 2.02 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าแคลเซียมในเลือดของประชากรไทยปกติที่มีรายงานไว้ ($0.45-2.11$ ไมโครกรัมต่อลิตร) ในขณะที่ระดับแคลเซียมในปัสสาวะ สูงกว่าค่าอ้างอิงขององค์การอนามัยโลก (2 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน) ถึง 3 เท่า เกษตรกรมีค่าแคลเซียมในเลือด และปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มอาชีพอื่น ๆ

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับสัมผัสแคลเซียมกับเมแทบอลิซึมของกระดูก ได้ตรวจวัดระดับตัวบ่งชี้การละลายของกระดูก ได้แก่ urinary deoxypyridinoline (DPD) และ type I collagen crosslinked N-telopeptide (NTx) ในประชากรอายุมากกว่า 50 ปี ผลการศึกษาพบว่าทั้ง

DPD ของชาย (5.22 ± 1.39 นาโนโมลต่อมิลลิโมลครีเอตินิน) และหญิง (8.30 ± 1.44 นาโนโมลต่อมิลลิโมลครีเอตินิน) และ NTx ของชาย (43.50 ± 1.80 นาโนโมลต่อมิลลิโมลครีเอตินิน) และหญิง (65.16 ± 1.77 นาโนโมลต่อมิลลิโมลครีเอตินิน) มีความสัมพันธ์กับระดับของแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น และแสดงความสัมพันธ์เชิงบวกกับอัตราการขับออกของแคลเซียมในปัสสาวะ ปริมาณค่าบ่งชี้การ

ละลายของกระดูกในหญิงสูงกว่าค่า cutoff ที่ใช้บ่งชี้ความเสี่ยงของการเกิดกระดูกแตกหัก (กล่าวคือ DPD มากกว่า 7.6 นาโนโมลต่อมิลลิโมลครีเอตินินและ NTx มากกว่า 54.3 นาโนโมล BCE ต่อมิลลิ

โมลครีเอตินิน) ผลการวิเคราะห์ด้วย multivariate regression ซึ่งให้เห็นว่ามีการกระตุ้นการละลายของกระดูกเนื่องจากความผิดปกติของการดูดซึมกลับแคลเซียมในท่อไต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรที่มีระดับแคลเซียมในปัสสาวะมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน

ค่าบ่งชี้การทำงานผิดปกติของท่อไตในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่า β_2 -microglobulin (β_2 -MG) = 237.14 ± 7.43 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน) มีค่าสูงกว่าค่าปกติ (กล่าวคือ 156 ± 3.10 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน) แต่ N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 5.52 ± 1.86 ยูนิตต่อกรัมครีเอตินิน) และ serum cystatin C (1.09 ± 1.36 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีค่าใกล้เคียงกับค่าปกติ (กล่าวคือ NAG 4.40 ± 1.90 ยูนิตต่อกรัมครีเอตินิน ส่วน serum cystatin C น้อยกว่า 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตามระดับแคลเซียมในปัสสาวะแสดงความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับค่าบ่งชี้การทำงานผิดปกติของท่อไต แสดงให้เห็นว่ามีความผิดปกติของท่อไตเกิดขึ้นในกลุ่มประชากรที่ศึกษานี้

ตรวจพบโรคโลหิตจางซึ่งกำหนดโดยใช้ค่าฮีโมโกลบินต่ำกว่า 13 กรัมต่อเดซิลิตรในชาย และต่ำกว่า 12 กรัมต่อเดซิลิตรในหญิงในประชากรจำนวน 162 คน (ชาย 60 และหญิง 102) ปริมาณแคลเซียมในปัสสาวะของประชากรที่มีโรคโลหิตจาง (7.52 ± 2.01 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน) มี

ค่าสูงกว่าปริมาณแคลเซียมในปัสสาวะของประชากรที่ไม่มีโรคโลหิตจาง (6.51 ± 1.88 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ความเข้มข้นของ β_2 -MG มีความสัมพันธ์กับความชุกของโรคโลหิตจางมากกว่า NAG และ cystatin C ส่วนหญิงที่มีระดับ β_2 -MG มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน มีโอกาสพบโรคโลหิตจาง 2.77 เท่า (odd ratio) ซึ่งมากกว่าหญิงที่มีระดับ β_2 -MG น้อยกว่า 400 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน ($p < 0.001$) ในขณะที่ชายที่มีระดับ β_2 -MG มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อกรัมครีเอตินิน มีโอกาสพบโรคโลหิตจางเพียง 1.61 เท่า นอกจากนี้ค่า

odd ratio ของหญิงที่มีระดับ NAG มากกว่า 8 ยูนิตต่อกรัมครีเอตินิน และ cystatin C มากกว่า 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มอื่น ($p < 0.05$)

การแสดงออกของ mRNA ของยีน osteocalcin, Col1A1 และ OPG พบในเซลล์ hFOB ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7.72 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน bone alkaline phosphatase และ RANKL อย่างไรก็ตามผลการแสดงออกของยีนจากงานวิจัยครั้งนี้ยังไม่สามารถใช้สรุปถึงกลไกการออกฤทธิ์โดยตรงของแคลเซียมต่อเซลล์กระดูกได้ มีองค์ประกอบหลายอย่างในการเลี้ยงเซลล์ที่ต้องปรับให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนของเซลล์(อ่อน)สร้างกระดูก

การศึกษานี้สรุปได้ว่าการสัมผัสกับแคลเซียมแบบเรื้อรังมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของกระดูก และพยาธิสภาพของท่อไต ในประชากรอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพศหญิง ความชุกของโรคไตเรื้อรังในกลุ่มประชากรศึกษามากกว่าประชากรปกติซึ่งอาจนำไปสู่การดูดซึมแคลเซียมจากอาหารเข้าสู่ร่างกายมากขึ้น ดังนั้นควรมีการติดตามและเฝ้าระวังสุขภาพของประชากรกลุ่มนี้อย่างใกล้ชิดเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคไตและกระดูก ตลอดจนการเกิดโรคต่อระบบอื่น ๆ ในร่างกาย



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved