

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการวิจัยในบทที่ 3 แสดงให้เห็นว่า silymarin มีผล 2 แบบต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย ได้แก่ แบบที่ 1 silymarin ออกฤทธิ์เป็น uncoupler กระตุ้นการหายใจ state 4 ของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็น substrate (รูปที่ 19) และแบบที่ 2 silymarin ออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของลูโซการหายใจทำให้ state 3 และ 3u respiration มีอัตราลดลงด้วย (รูปที่ 17 และ 20) ส่วนผลของ silymarin ต่อการทำงานอื่นๆของไมโทคอนเดรียที่แสดงไว้ก็คือ silymarin สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย (ตารางที่ 11) ยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยแคลเซียมและยับยั้ง activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase เมื่อใช้ benzylamine เป็น substrate (รูปที่ 25)

ผลของ silymarin ต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรีย

จากที่กล่าวข้างต้น silymarin ออกฤทธิ์เป็นทั้ง uncoupler และ respiratory chain inhibitor ในที่นี้จะกล่าวถึงผลดังกล่าวรวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ที่น่าจะเป็นไปได้

1. silymarin ออกฤทธิ์เป็น uncoupler

จากผลการวิจัยในบทที่ 3 พบว่า silymarin มีลักษณะบางประการเหมือนกับ classical uncouplers คือ เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติของสารซึ่งละลายในไขมันได้ดี (lipophilic) และจากผลของ silymarin ต่อ activity ของเอนไซม์ ATPase (ตารางที่ 11) พบว่า silymarin สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase เมื่อไม่มี DNP ได้ และมีความแรงต่อการตอบสนองแปรผันตามความเข้มข้นของยาที่ใช้ แต่ฤทธิ์ uncoupling น้อยกว่า DNP มาก อย่างไรก็ตามฤทธิ์ uncoupling นี้เกิดเมื่อใช้ succinate เป็น substrate เท่านั้น

เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate silymarin จะออกฤทธิ์ยับยั้ง state 4 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลนี้เหมือนกับ nonclassical uncouplers หลายตัวเช่น ketamine (63), dipyridamol (64), disulfuram (65), halothane (66) และ amine local anesthetics (67,68)

2. silymarin ออกฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor

นอกจาก silymarin มีฤทธิ์เป็น uncoupler เมื่อใช้ succinate เป็น substrate แล้วยังมีฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor หรือสารที่ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรียอีกด้วย โดยยับยั้งการหายใจ state 3 และ 3u จากผลการวิจัย รูปที่ 18 , 20 ซึ่งแสดง dose-response curve ของ silymarin ต่อการหายใจ state 4 , 3 และ 3u ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ substrate คือ glutamate + malate และ succinate ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ glutamate + malate ซึ่งให้ reducing equivalent เข้าที่ complex I ของลูกลูกโซ่การหายใจเป็น substrate silymarin ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจใน state 3 และ 3u แต่เมื่อเปลี่ยน substrate เป็น succinate ซึ่งให้ reducing equivalent เข้าที่ complex II ของลูกลูกโซ่การหายใจ พบว่า silymarin กระตุ้นการหายใจ state 4 และยับยั้งการหายใจ state 3 และ 3u ของไมโทคอนเดรีย ผลในการยับยั้งนี้น้อยกว่าเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate แสดงว่า silymarin ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนที่ complex I มากกว่าที่ complex อื่น ของลูกลูกโซ่การหายใจ

เมื่อทำการวิจัยหาข้อสนับสนุน โดยทำการทดลองดูผลของ silymarin ในการยับยั้ง state 3u ของ ไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำทั้งใน intact และ osmotic-shocked mitochondria (ตารางที่ 6 และ 7) พบว่าใน intact mitochondria ซึ่งถูกกระตุ้นให้เกิด state 3u โดยการเติม DNP แล้วดูผล silymarin ต่อการหายใจเมื่อใช้ substrate 3 ชนิด แต่ละชนิดให้ reducing equivalent เข้าที่ complex ต่างๆของ ลูกลูกโซ่การหายใจ ผลที่ได้คือ silymarin ยับยั้งการหายใจ state 3u เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็น substrate และไม่เกิดผลนี้เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็น substrate ส่วนผลการทดลองกับ osmotic-shocked mitochondria ซึ่งไมโทคอนเดรียอยู่ในภาวะ uncoupling อยู่แล้ว จึงไม่ต้องเติม DNP ไปกระตุ้นแล้วดูผลของ silymarin ต่อการหายใจ state 3u โดยใช้

substrates 3 ชนิดเช่นเดียวกับใน intact mitochondria ผลคือ silymarin ความเข้มข้น 300 μM ไม่สามารถยับยั้ง state 3u เมื่อใช้ substrates ทั้ง 3 ชนิด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ silymarin เป็น 1125 μM จึงยับยั้งการหายใจ state 3u เมื่อใช้ NADH และ succinate เป็น substrates ผลนี้สนับสนุนว่า silymarin ออกฤทธิ์เป็น respiratory chain inhibitor ที่ complex I และ complex II และ / หรือ complex III ของลูกโซ่การหายใจ แต่ไม่มีผลยับยั้ง complex IV ส่วนที่ว่า silymarin ในความเข้มข้น 300 μM ซึ่งเห็นผลการยับยั้งชัดเจนเมื่อทดลองกับ intact mitochondria แต่ไม่เห็นผลเมื่อทดลองกับ osmotic-shocked mitochondria อาจเป็นเพราะว่า ใน osmotic-shocked mitochondria นั้นผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียมีการยืด ทำให้ความไวในการออกฤทธิ์ของ silymarin ลดลงจึงเห็นผลการยับยั้งเมื่อใช้ความเข้มข้นสูง

จากการที่ silymarin กระตุ้นการหายใจ state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate และยับยั้งการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียทั้งที่เมื่อใช้ glutamate + malate หรือ succinate เป็น substrate ทำให้ค่า RCI ของไมโทคอนเดรียลดลงหรืออีกนัยหนึ่ง silymarin ลดการควบคุมของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสโฟรีลเลชัน เป็นผลให้การสร้าง ATP โดยไมโทคอนเดรียเกิดน้อยลง (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาผลของ pH แล้วพบว่า silymarin สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้ดีเมื่ออยู่ใน incubation medium ที่ pH 7.2 มากกว่าที่ 6.8 และ 7.6 (ตารางที่ 8) อาจเป็นไปได้ว่า silymarin ซึ่งมีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดีแม้จะอยู่ในรูป ionized form หรือ unionized form ก็สามารถออกฤทธิ์ได้พอๆกันและเมื่อมี silymarin ทั้ง 2 รูปแบบในอัตราส่วนที่เท่ากันใน incubation medium (pH 7.2) จะทำให้ silymarin ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด

คุณสมบัติของ silymarin อีกประการหนึ่งคือสามารถจับกับ plasma protein ได้ 90-95% จึงได้ทำการทดลองดูผลของ bovine serum albumin (BSA) ต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียดังผลวิจัยในรูปที่ 23 ซึ่งแสดงว่าเมื่อให้ silymarin ร่วมกับ BSA เปรียบเทียบกับผลที่ไม่ได้เติม BSA ผลคือ BSA สามารถลดผลของ silymarin ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียได้อย่างมีนัยสำคัญซึ่งผลนี้

สนับสนุนรายงานการวิจัยที่ว่า silymarin จับได้ดีกับ serum albumin แต่สามารถกลับสู่สภาวะเดิมได้ (reversibly bound) (69) ดังนั้นจากผลการวิจัยจะเห็นว่า BSA ไม่สามารถทำให้อัตราการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียกลับมาเท่ากับกลุ่มควบคุมได้ และเนื่องจาก BSA เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ซึ่งไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย การที่ BSA สามารถลดผลของ silymarin ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย ชี้แนะว่า silymarin ควรมิตำแหน่งการออกฤทธิ์ที่ผิวด้านนอกของผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย

การทดลองดูผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin (ตารางที่ 9 และ 10) ทำเพื่อพิสูจน์ว่า silymarin ออกฤทธิ์ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยการจับ sulhydryl group (-SH) ของไมโทคอนเดรียหรือไม่ ทั้งนี้เพราะ DTT มีคุณสมบัติป้องกัน sulhydryl group ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิด รวมทั้งการทำงานของโปรตีนที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียที่ควบคุมการขนส่งสารผ่านเข้า-ออกจากไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการควบคุมกันของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริลเลชันอีกด้วย จากผลการวิจัยพบว่า DTT ไม่สามารถลดผลของ silymarin ที่มีต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย แสดงว่า silymarin ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยผ่านกลไกการจับกับ -SH group ของ ไมโทคอนเดรีย แต่อย่างใด

ผลของ silymarin ต่อการทำงานอื่นของไมโทคอนเดรีย

1. ผลของ silymarin ต่อ ATPase activity

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่า silymarin ยับยั้ง activity ของเอนไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP และกระตุ้น ATPase activity เมื่อไม่ได้เติม DNP ด้วย แต่ฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ของ silymarin อ่อนกว่า DNP มาก ในการวิจัยนี้ใช้ DNP ในปริมาณที่สามารถก่อกำการกระตุ้น ATPase activity ได้สูงสุด จากผลที่ได้สามารถบ่งชี้ได้ว่า silymarin ออกฤทธิ์ 2 แบบ คือมีฤทธิ์ก่อกำการกระตุ้นและยับยั้ง activity ของเอนไซม์ได้ แต่จะออกฤทธิ์แบบใดขึ้นกับภาวะ (condition) ของการทำทดลองโดยถ้า ATPase activity ถูกกระตุ้นเต็มที่อยู่แล้วด้วยการให้ DNP silymarin จะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง ATPase activity แต่ความแรงในการยับยั้งนี้

น้อยกว่า oligomycin มาก ส่วนกรณีที่ไม่เติม DNP ลงไปกระตุ้น ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งในภาวะนี้ไมโทคอนเดรีย จะมี ATPase activity ที่ต่ำมาก พบว่า silymarin สามารถกระตุ้น activity ของเอนไซม์ ATPase ได้ ผลนี้สอดคล้องกับฤทธิ์ของ silymarin ในการกระตุ้นการหายใจใน state 4 ของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็น substrate

2. ผลของ silymarin ต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยแคลเซียม

ปกติแล้วไมโทคอนเดรียสามารถสะสมแคลเซียมได้โดยอาศัยพลังงานที่ได้จากการขนส่งอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ หรือใช้พลังงานจาก protonmotive force นั้นเอง silymarin สามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียโดยแคลเซียม (รูปที่ 24) ทั้งนี้เนื่องจาก silymarin ยับยั้งการส่งผ่านที่ระดับของ complex I และ complex II และ / หรือ complex III ในลูกโซ่การหายใจ ดังนั้นจึงไม่เกิด protonmotive force โดยเฉพาะอย่างยิ่ง membrane potential ที่จำเป็นสำหรับใช้ในการนำแคลเซียมเข้าสู่ไมโทคอนเดรียโดยผ่าน Ca^{2+} uniporter และการยับยั้งการขนส่งแคลเซียมที่เกิดขึ้นนี้ ไม่ควรเกิดจากการที่ silymarin ไปมีผลยับยั้งการทำงานของ Ca^{2+} uniporter รวมอยู่ด้วย โดยพิจารณาจากผลการทดลองในรูปที่ 24 silymarin ยับยั้งการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนโดยแคลเซียมให้ลดลงได้พอๆกับที่สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration เมื่อใช้ silymarin ความเข้มข้นเท่ากัน แสดงว่า การยับยั้งการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซียม ควรจะมีผลจากการที่ silymarin ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรียเพียงอย่างเดียว

3. ผลของ silymarin ต่อ activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase

การทดลองนี้ดูผลของ silymarin ต่อ activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ที่ผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย และทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารโมโนเอมีน ในการทดลองนี้ใช้ benzylamine เป็น monoamine substrate และใช้ pargyline ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้ง activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase เป็นมาตรฐานในการประเมินผลของ silymarin จากผลการวิจัยที่แสดงในรูปที่ 25 ซึ่งให้เห็นว่า silymarin สามารถยับยั้ง activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase ของไมโทคอนเดรีย

ความเกี่ยวข้องของระหวางผลวิจัยที่ได้กับคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา และ/หรือพิษวิทยาของ silymarin

จากข้อมูลของ silymarin ที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้งการทดลองภายนอกร่างกาย (in vitro) และภายในร่างกาย (in vivo) ในสัตว์ทดลอง พบว่า silymarin มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ตับจากการได้รับสารที่เป็นพิษต่างๆ เช่น CCl_4 , paracetamol , galactosamine เป็นต้น โดยอาศัยกลไกที่สำคัญคือ ปิดกั้น binding sites (ที่เซลล์เมมเบรนของตับ) ของสารที่เป็นพิษ , antiperoxidative action และกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนเร่งให้เซลล์ regenerate ได้เร็วและเมื่อได้มีการศึกษาในทางคลินิกโดยนำมาใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอักเสบและตับแข็งจากสาเหตุต่างๆก็พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคและลดอัตราการตายของผู้ป่วยลงได้ ทำให้ได้มีการนำ silymarin มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคตับ และจนกระทั่งถึงปัจจุบันนี้อาการข้างเคียงที่พบจากการใช้ยามีเพียง อาการท้องร่วงอย่างอ่อนเท่านั้น

ส่วนข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ปรากฏว่า silymarin มีฤทธิ์ uncoupling และสามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ยังเพิ่มการสลายของ ATP มากขึ้นโดยการกระตุ้น ATPase activity ซึ่งฤทธิ์เหล่านี้อาจจะทำให้ปริมาณของ ATP ภายในเซลล์ลดน้อยลงได้ และเนื่องจาก ATP เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเซลล์ การลดลงของ ATP น่าจะส่งผลที่ไม่พึงประสงค์เมื่อได้มีการใช้ยานี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ซึ่งตรงกันข้ามกับข้อมูลข้างต้นที่พบว่า silymarin มีฤทธิ์ในการป้องกันตับทั้งนี้อาจเป็นเพราะวากลไกที่ทำให้ silymarin มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ตับเด่นชัดกว่าการที่ไปมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย รวมทั้งความสามารถในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนทำให้เซลล์มีการ regenerate ได้เร็วช่วยลดผลเสียดังกล่าวด้วย นอกจากนี้การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยภายนอกร่างกาย (in vitro) และให้สาร silymarin ลงไปในไมโทคอนเดรียที่ปกติไม่ได้รับสารที่เป็นพิษมาก่อน ซึ่งถ้าหากทำการวิจัยภายในร่างกาย (in vivo) ซึ่งมีกลไกที่ซับซ้อนหรือให้สารนี้ภายหลังจากการได้รับสารที่เป็นพิษก็อาจให้ผลที่แตกต่างไปจากการวิจัยครั้งนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามการวิจัยในครั้งนี้ก็สามารถที่จะชี้แนะได้ว่าหากมีการใช้ยา silymarin อย่างไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดผลเสียที่เกิดจากกลไกที่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียได้ และในกรณีที่พบว่า silymarin สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้นั้นน่าจะเป็นข้อที่

ควรระวังสำหรับผู้ป่วยที่มีการใช้ยาพวก sympathomimetic amines ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular system) ได้

กล่าวโดยสรุป silymarin มีผล 2 แบบต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย คือ แบบที่ 1 เป็น uncoupler กระตุ้นการหายใจ state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate และกระตุ้นการทำงานของ ATPase ของไมโทคอนเดรีย แบบที่ 2 silymarin ออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนที่ complex I และ complex II และ / หรือ complex III ของลูกโซ่การหายใจ ทำให้การหายใจ state 3 และ state 3u ของไมโทคอนเดรียมีอัตราลดลง เป็นผลทำให้การควบคุมระหว่างกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริลเลชันเสียไป และทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรียลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า silymarin ยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง monoamine oxidase การใช้ silymarin อย่างไม่ถูกต้องหรือกรณีใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่อการทำงานของตับเนื่องจากระดับของ ATP ภายในเซลล์ลดลง แต่อย่างไรก็ตาม คงต้องมีการศึกษาต่อไปถึงผลของ silymarin ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียดังกล่าวว่ามีความเกี่ยวข้องหรือไม่กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ / หรือพิษวิทยาของยาตัวนี้