บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลของซิลไลมาริน (silymarin) ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับของหนูขาว

1.1 ผลของ silymarin ในขนาดต่างๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state ต่างๆ ของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 17 tracing A แสดงถึงอัตราการใช้ออกซิเจนตามปกติของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลอง (control) โดยตัวเลขในวงเล็บบ่งชี้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state ต่างๆ ของไมโตคอนเดรีย มีหน่วยเป็น นนอ.ออกซิเจน/มล./นาที ขณะเริ่มทำการทดลองจะมีไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน incubation medium ที่มี substrate มากเกินพอซึ่งในที่นี้ใช้ glutamate + malate เป็น substrate การหายใจระยะเริ่มแรกของไมโตคอนเดรียที่เกิดขึ้นมีอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำ เรียก state 4 respiration จากนั้นเมื่อเติม ADP + Pi ลงไป ไมโตคอนเดรียจะเกิดการสร้าง ATP ขึ้น ทำให้การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียมีอัตราเพิ่มขึ้น เรียกการหายใจภาวะนี้ว่า state 3 respiration เมื่อปริมาณ ADP + Pi ที่เติมลงไปถูกนำไปใช้สร้าง ATP จนหมด ภาวะการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย จะกลับสู่ state 4 respiration อีกครั้งหนึ่ง เราสามารถหาค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ได้ โดยนำอัตราการหายใจของ state 3 หาร ด้วย อัตราการหายใจของ state 4 และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ลงไป ไมโตคอนเดรียจะเกิดการใช้ออกซิเจน แต่ไม่เกิดการสร้าง ATP การใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่เกิดจากการกระตุ้นโดย DNP นี้จะมีอัตราเร็วสูงกว่า state 3 respiration เราเรียกการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย ขณะเกิดภาวะ uncoupling นี้ว่า state 3u respiration และไมโตคอนเดรียจะใช้ออกซิเจนใน reaction chamber จนหมด ($O_2 \cong 0$)

รูปที่ 17 tracings B , C และ D แสดงผลของ silymarin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย จะเห็นว่า silymarin ในขนาด 150 และ 300 μM ไม่มีผลต่อ state 4 respiration แต่เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 375 μM จึงเห็นผลในการยับยั้ง state 4 respiration

คือในขณะที่ยังไม่เติม silymarin อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เท่ากับ 33.37 นนอ. ออกซิเจน / มล./ นาที หลังจากเติม silymarin 375 μM อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเป็น 30.59 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที

เมื่อพิจารณาถึงผลของ silymarin ต่อการหายใจ state 3 และ state 3u พบว่า silymarin ลดอัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรีย ทั้ง 2 states

รูปที่ 18 แสดง dose-response curve ของ silymarin ในขนาดต่างๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate จะเห็นว่า ความแรงของการยับยั้งการหายใจ state 3 และ state 3u จะแปรผันตามปริมาณของ silymarin ที่เติมลงไป ส่วนการหายใจ state 4 นั้น silymarin มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อย

รูปที่ 19 tracing A เช่นเดียวกับรูปที่ 17 A ซึ่งแสดงถึงอัตราการใช้ออกซิเจนตามปกติของไมโตคอนเดรีย แต่เปลี่ยน substrate ที่ใช้เป็น succinate tracing B , C และ D แสดงผลของ silymarin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย จะเห็นว่า silymarin ความเข้มข้น 150 , 300 และ 375 μM มีผลกระตุ้น state 4 respiration และเมื่อพิจารณาถึงผลของ silymarin ต่อการหายใจ state 3 และ state 3u พบว่า silymarin ลดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย ทั้ง 2 states เช่นเดียวกับที่พบเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate และจากรูปที่ 20 ซึ่งแสดง dose-response curve ของ silymarin ในขนาดต่างๆ ที่มีต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็น substrate จะเห็นว่าความแรงในการกระตุ้นการหายใจ state 4 และความแรงในการยับยั้ง state 3 , 3u แปรผันตามปริมาณของ silymarin ที่เติมลงไป และผลในการยับยั้งการหายใจนี้จะน้อยกว่าเมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

1.2 ผลของ silymarin ในขนาดต่างๆ ที่มีต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราส่วน ADP/O ของไมโตคอนเดรีย (ตารางที่ 5)

1.2.1 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ในที่นี้ตัวทำละลาย silymarin ที่ใช้ คือ DMSO ซึ่งไม่มีผลต่อคุณภาพของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate ค่า RCI และอัตราส่วน ADP/O ที่ได้มีค่าเฉลี่ย 5.49 และ 2.90 ตามลำดับ เมื่อเติม silymarin

ความเข้มข้น 75 , 150 , 225 และ 300 μM ลงไป ค่า RCI ลดลงเป็น 3.75 , 2.88 , 1.95 และ 1.26 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ามีนัยสำคัญทั้ง 4 ความเข้มข้น ส่วนค่า ADP/O ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ silymarin ในความเข้มข้น 150 μM ขึ้นไป

1.2.2 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

เช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 DMSO ไม่มีผลต่อคุณภาพของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate ค่า RCI และ ADP/O ที่ได้มีค่าเฉลี่ย 3.96 และ 1.83 ตามลำดับ เมื่อเติม silymarin ในความเข้มข้น 75 , 150 , 225 และ 300 μM มีผลลดค่า RCI และ อัตราส่วน ADP/O ของ ไมโตคอนเดรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.3 ผลของ silymarin ต่อ state 3u respiration

1.3.1 เมื่อทดลองกับ intact mitochondria

ไมโตคอนเดรีย ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น intact mitochondria คือ ไมโตคอนเดรีย ที่เตรียมขึ้นมาตามวิธีปกติและมีคุณภาพดี ผนังของไมโตคอนเดรียมีคุณสมบัติเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) substrate ที่ใช้มีอยู่ 3 ชนิด แต่ละชนิดให้ reducing equivalent เข้าที่ complex ของ ลูกโซ่การหายใจ ที่ตำแหน่งต่างๆกัน substrate ดังกล่าวได้แก่ glutamate + malate ให้ reducing equivalent (NADH) เข้าที่ complex I, succinate ให้ reducing equivalent ($FADH_2$) เข้าที่ complex II และ ascorbate + TMPD ให้ reducing equivalent เข้าที่ complex IV ของ ลูกโซ่การหายใจ เริ่มต้นเติม DNP ลงไปใน chamber ที่มี ไมโตคอนเดรีย incubate อยู่ใน incubation medium โดย DNP ทำหน้าที่เป็น uncoupler กระตุ้นการหายใจ state 3u (เกิดภาวะ uncoupling) จน ไมโตคอนเดรีย ใช้ endogeneous substrate หมด จึงเติม silymarin 300 μM หรือ 1125 μM ลงไป incubate นาน 1 นาที แล้วใส่ substrate ให้เกิด state 3u ต่อไปจน ปริมาณออกซิเจนใน chamber ลดลงเป็นศูนย์ เปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุม ซึ่งใช้ DMSO ปริมาตร 10 มคล. แทน silymarin

1.3.1.1 กรณีใช้ glutamate + malate เป็น substrate

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่า silymarin ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของ intact mitochondria เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดย silymarin ความเข้มข้น 300 μM ลดอัตราการใช้ออกซิเจนเฉลี่ยจากเดิม 177.29 ± 19.08 เป็น 46.65 ± 1.01 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน และ silymarin ความเข้มข้น 1125 μM ลดอัตราการใช้ออกซิเจนจากเดิม 177.29 ± 19.08 เป็น 8.86 ± 1.40 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน

1.3.1.2 กรณีใช้ succinate เป็น substrate

เช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.1 silymarin สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจน state 3u ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยลดอัตราการใช้ออกซิเจนเฉลี่ยจากเดิม 161.52 ± 9.12 ลงเป็น 112.12 ± 12 และเป็น 45.78 ± 10.7 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน เมื่อเติม silymarin ความเข้มข้น 300 และ 1125 μM ตามลำดับ

1.3.1.3 กรณีใช้ ascorbate + TMPD เป็น substrate

ข้อมูลในตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า silymarin ไม่เปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน ใน state 3u อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 226.33 ± 0.09 เป็น 232.56 ± 10.14 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน เมื่อเติม silymarin ความเข้มข้น 300 μM และลดลงเป็น 175.21 ± 20.35 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน เมื่อเติม silymarin ความเข้มข้น 1125 μM

1.3.2 เมื่อทดลองกับ osmotic-shocked mitochondria

Osmotic-shocked mitochondria คือ ไมโตคอนเดรีย ที่ถูกทำให้สูญเสียคุณสมบัติของเยื่อเลือกผ่านและอยู่ในสภาวะ uncoupling โดยการนำไมโตคอนเดรีย มา resuspend ใน 0.01 M sucrose ซึ่งเป็น hypotonic กับ ไมโตคอนเดรีย substrate ที่ใช้มี 3 ชนิด เช่นเดียวกับข้อ 1.3.1 แต่เปลี่ยน glutamate + malate เป็น NADH ซึ่งเป็น reducing equivalent ของ glutamate + malate เอง เนื่องจากผนังของ osmotic-shocked mitochondria นี้ยอมให้ NADH ผ่านเข้าได้เลย ขั้นตอนการทดลองเริ่มโดยนำไมโตคอนเดรีย มา preincubate กับ silymarin ขนาด 300 μM หรือ 1125 μM นาน 1 นาที

แล้วจึงเติม substrate ลงไปเพื่อให้เกิด state 3u จน ไมโตคอนเดรีย ใช้ออกซิเจนใน chamber หมด เปรียบเทียบผลเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1

1.3.2.1 กรณีใช้ NADH เป็น substrate

จากข้อมูลในตารางที่ 7 จะเห็นว่า silymarin ในขนาด 300 μM ไม่สามารถยับยั้ง state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 35.55 ± 9.72 เป็น 27.19 ± 7.69 นนอ.ออกซิเจน / มล. / นาที / มก.โปรตีน แต่สามารถยับยั้ง state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria นี้ได้เมื่อเติม silymarin ความเข้มข้น 1125 μM โดยอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเป็น 15.42 ± 4.44 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.3.2.2 กรณีใช้ succinate เป็น substrate

ผลการวิจัยในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า silymarin ความเข้มข้น 300 μM ไม่สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u โดยที่อัตราการใช้ออกซิเจนไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 50.52 ± 7.10 เป็น 48.62 ± 9.09 แต่เมื่อใช้ silymarin ความเข้มข้น 1125 μM สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนใน state 3u โดยอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงจาก 50.52 ± 7.10 เป็น 25.89 ± 6.86 นนอ. ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.3.2.3 กรณีใช้ ascorbate + TMPD เป็น substrate

ข้อมูลในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า silymarin ไม่เปลี่ยนแปลงการใช้ออกซิเจนใน state 3u โดยที่อัตราการใช้ออกซิเจนเปลี่ยนแปลงจาก 163.65±16.82 เป็น 175.83± 25.97 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน และเป็น 171.42 ± 47.09 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน เมื่อใช้ silymarin ความเข้มข้น 300 และ 1125 μM ตามลำดับ โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลของตารางที่ 6 และตารางที่ 7 จะพบว่า silymarin ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ทั้งใน intact mitochondria และใน osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ substrate ที่ให้อิเลคตรอนเข้าสู่ complex I และ II ของ ลูกโซ่การหายใจ แต่ไม่ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u เมื่อใช้ ascorbate + TMPD เป็น

substrate ซึ่งให้อิเลคตรอนเข้าสู่ complex IV ในไมโตคอนเดรีย ทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้จะเห็นผลการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ของ osmotic-shocked mitochondria อย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ silymarin ความเข้มข้น 1125 μM เท่านั้น กรณีที่ใช้ glutamate + malate และ succinate เป็น substrate

1.4 ผลของ silymarin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD^+ -linked substrates ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ glutamate + malate

1.4.1 เมื่อใช้ β-hydroxybutyrate เป็น substrate

ในรูปที่ 21 tracing A แสดงอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในกลุ่มควบคุม ส่วน tracing B เป็นกลุ่มทดลองซึ่งจะเติม silymarin ความเข้มข้น 300 μM ลงไป incubate นาน 2 นาที ก่อนเติม ADP + Pi ผลคือ silymarin ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 จาก 33.37 เป็น 25.03 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที เมื่อพิจารณาผลของ silymarin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 , 3u พบว่า silymarin ยับยั้งการหายใจทั้ง 2 states

1.4.2 เมื่อใช้ α - ketoglutarate เป็น substrate

จากรูปที่ 22 tracing B ซึ่งแสดงผลของ silymarin ความเข้มข้น 300 μM ต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (tracing A) จะเห็นว่าหลังจากเติม silymarin ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 2 นาที พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ลดลงจาก 47.27 เป็น 33.37 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที และ silymarin ออกฤทธิ์ยับยั้ง state 3 และ 3u อย่างชัดเจน

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า silymarin สามารถยับยั้งการหายใจใน state 3 และ 3u ของ ไมโตคอนเดรีย และลดค่า RCI เมื่อใช้ NAD^+ -linked substrates ทั้ง 3 ชนิด คือ glutamate + malate , β-hydroxybutyrate และ α - ketoglutarate

1.5 ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

1.5.1 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อการหายใจใน state 3 และ 3u ของ ไมโตคอนเดรีย

จากตารางที่ 8 จะเห็นว่า silymarin ความเข้มข้น 300 μM มีผลยับยั้งการหายใจทั้ง state 3 และ 3u อย่างมีนัยสำคัญ ทุกค่า pH และเมื่อเปรียบเทียบค่า % inhibition พบว่า silymarin มีฤทธิ์ยับยั้งยับยั้งการหายใจทั้ง state 3 และ 3u ที่ pH 7.2 ได้มากกว่าที่ pH 6.8 และ 7.6 ซึ่งที่ pH ทั้ง 2 นี้พบว่า % inhibition แตกต่างกันน้อยมาก คือ การหายใจ state 3 ถูกยับยั้ง 64.81 % และ 60.63 % ตามลำดับ ส่วนการหายใจ state 3u ถูกยับยั้ง 51.24 % และ 53.23 % ตามลำดับ

1.5.2 ผลของ dithiothretiol (DTT) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

DTT เป็นสารที่มีคุณสมบัติป้องกัน sulhydryl group (-SH) ซึ่งจะถูกเติมลงไป incubate กับไมโตคอนเดรีย นาน 1 นาทีก่อนเติม silymarin จากตารางที่ 9 เป็นกรณีที่ใช้ glutamate + malate เป็น substrate เมื่อพิจารณาอัตราการหายใจใน state 4 ซึ่ง silymarin ความเข้มข้น 300 μM ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อให้ DTT ลงไปก่อนเติม silymarin ก็พบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจเช่นกัน นอกจากนี้ยังไม่มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจใน state 3 และ 3u อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

จากตารางที่ 10 เป็นกรณีที่ใช้ succinate เป็น substrate พบว่า DTT ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของ silymarin ในการกระตุ้นการหายใจใน state 4 และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งการหายใจใน state 3 และ 3u อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

1.5.3 ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย

จากรูปที่ 23 แสดงการเปรียบเทียบผลของการเติม BSA ในขนาดต่างๆ คือ 5 , 10 , 20 และ 30 มก. ต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ความเข้มข้น 300 μM ที่มีต่อการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 3 จะเห็นว่า BSA มีผลให้ silymarin ออกฤทธิ์ยับยั้งการ

หายใจของไมโตคอนเดรียได้ลดลง หรือ สามารถ reverse การหายใจของไมโตคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย silymarin ได้ จากรูปจะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของ ไมโตคอนเดรีย ซึ่งเติม silymarin แต่ไม่เติม BSA เท่ากับ 38.75 $\pm$8.05 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที / มก.โปรตีน แต่เมื่อเติม BSA ในขนาด 5 , 10 , 20 และ 30 มก. ลงไปพบว่า BSA ในขนาด 5 มก. ก็สามารถลดผลการยับยั้ง state 3 respiration โดย silymarin ได้ โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มเป็น 58.79 $\pm$4.97 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที /มก.โปรตีน ส่วน BSA ขนาด 10 , 20 และ 30 มก. ก็ให้ผลลดการยับยั้ง state 3 respiration โดย silymarin มากขึ้นเป็นลำดับ และพบว่า BSA ในขนาด 20 มก. ให้ผลมากที่สุดโดยอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น 81.71$\pm$8.62 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที /มก.โปรตีน ($p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ silymarin 300 μM) ส่วน BSA ในขนาด 30 มก.ให้ผลใกล้เคียงกัน คือให้อัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 76.29$\pm$5.84 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที /มก.โปรตีน ($p = 0.05$)

2. ผลของ silymarin ต่อ ATPase activity ของ ไมโตคอนเดรีย

ATPase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญของไมโตคอนเดรียมีหน้าที่สร้างและสลาย ATP จึงทำการศึกษาผลของ silymarin ที่มีต่อ activity ของเอนไซม์นี้ เพื่อใช้เป็นดัชนีหนึ่งที่บ่งชี้ผลของ silymarin ต่อการทำงานของ ไมโตคอนเดรีย ในการวิจัยนี้วัด activity ของเอนไซม์ ATPase โดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น ผลการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 กรณีคือ

2.1 ผลของ ATPase activity เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

จากตารางที่ 11 จะเห็นว่า silymarin ทั้งความเข้มข้น 300 และ 600 μM มีผลกระตุ้น activity ของเอนไซม์ ATPase อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และความแรงในการกระตุ้นแปรผันตามขนาดของ silymarin ที่เติมลงไป

DNP สามารถกระตุ้นการสลายของ ATP ได้อย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น uncoupler ซึ่งสามารถกระตุ้น ATPase activity โดยทำให้มีการสลาย ATP ไปเป็น ADP + Pi และผลของการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ถูกยับยั้งได้ด้วย oligomycin

จากตารางเมื่อเปรียบเทียบการกระตุ้น ATPase activity โดย DNP และ silymarin จะเห็นว่า silymarin ความเข้มข้น 300 และ 600 μM สามารถกระตุ้นการทำงาน

ของ ATPase ได้น้อยกว่า 0.1 mM DNP มาก คือเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1 mM DNP พบว่าสามารถกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ได้เพียง 6.64 % และ 16.02 % ของ DNP ตามลำดับ

2.2 ผลของ ATPase activity เมื่อถูกกระตุ้นด้วย DNP

เมื่อใส่ 0.1 mM DNP รวมกับ silymarin ความเข้มข้น 300 และ 600 μM จะทำให้ฤทธิ์ในการกระตุ้น ATPase activity ของ DNP ลดลงจาก 5.25 ±0.36 เป็น 4.38 ±0.25 และเป็น 2.80 ±0.55 มคม./มก.โปรตีน/ 10 นาที ตามลำดับและมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่การยับยั้งที่เกิดขึ้นจะมีค่าน้อยกว่าผลของ oligomycin ในการยับยั้งการกระตุ้น ATPase activity ของ DNP อย่างมาก

3. ผลของ silymarin ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย Ca^{2+}

รูปที่ 24 tracing A แสดงถึงการหายใจปกติของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

รูปที่ 24 tracing B เมื่อมีการเติม Ca^{2+} (ในสภาวะที่มี Pi อยู่) พบว่า Ca^{2+} สามารถกระตุ้นให้มีการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้เช่นเดียวกับการใส่ ADP + Pi ลงไปทำปฏิกิริยาและอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเมื่อ Ca^{2+} ถูกสะสมโดยไมโตคอนเดรีย การใส่ silymarin ความเข้มข้น 300 μM ลงไปทำปฏิกิริยาก่อนที่จะใส่ Ca^{2+} พบว่า Ca^{2+} กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้น้อยลง ดังรูปที่ 24 C และเมื่อใช้ silymarin ความเข้มข้น 600 μM พบว่า Ca^{2+} กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้น้อยมาก ดังแสดงใน รูปที่ 24 D

4. ผลของ silymarin ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity

การทดลองนี้ศึกษาถึงผลของ silymarin ต่อ activity ของเอนไซม์ MAO ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ที่ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียในที่นี้ใช้ benzylamine เป็น monoamine substrate และมี rotenone ทำหน้าที่เป็น respiratory chain inhibitor ซึ่งจะยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrate ของ ไมโตคอนเดรีย เพื่อให้สามารถแปลผลได้ว่าการใช้ออกซิเจนที่เกิดขึ้นเกิดจากการออกซิไดซ์ benzylamine โดย MAO เท่านั้น

รูปที่ 25 tracing A แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียกลุ่มควบคุม ซึ่งเติม DMSO 10 มคล. ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 2 นาที ก่อนเติม benzylamine พบว่า ไมโตคอนเดรียมีการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ benzylamine เท่ากับ 33.37 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที ส่วน tracing B และ C ซึ่งเติม silymarin ความเข้มข้น 300 และ 600 μM แทน DMSO ตามลำดับ จะเห็นว่า silymarin ยับยั้งการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ benzylamine โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนเท่ากับ 22.25 และ 19.46 นนอ. ออกซิเจน / มล./ นาที ตามลำดับ

ในรูปที่ 25 D แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ benzylamine ของไมโตคอนเดรียเมื่อเติม pargyline ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งของ MAO ลงไป incubate กับไมโตคอนเดรียนาน 2 นาที ก่อนเติม benzylamine จะเห็นว่าอัตราการใช้ออกซิเจนหลังเติม benzylamine ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและลดลงมากกว่ากลุ่มทดลองที่ใช้ silymarin ความเข้มข้น 300 , 600 μM โดยอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 13.90 นนอ.ออกซิเจน / มล./ นาที แสดงว่า การออกซิไดซ์ benzylamine โดยเอนไซม์ MAO ถูกยับยั้งด้วย pargyline และผลในการยับยั้งมีมากกว่า silymarin

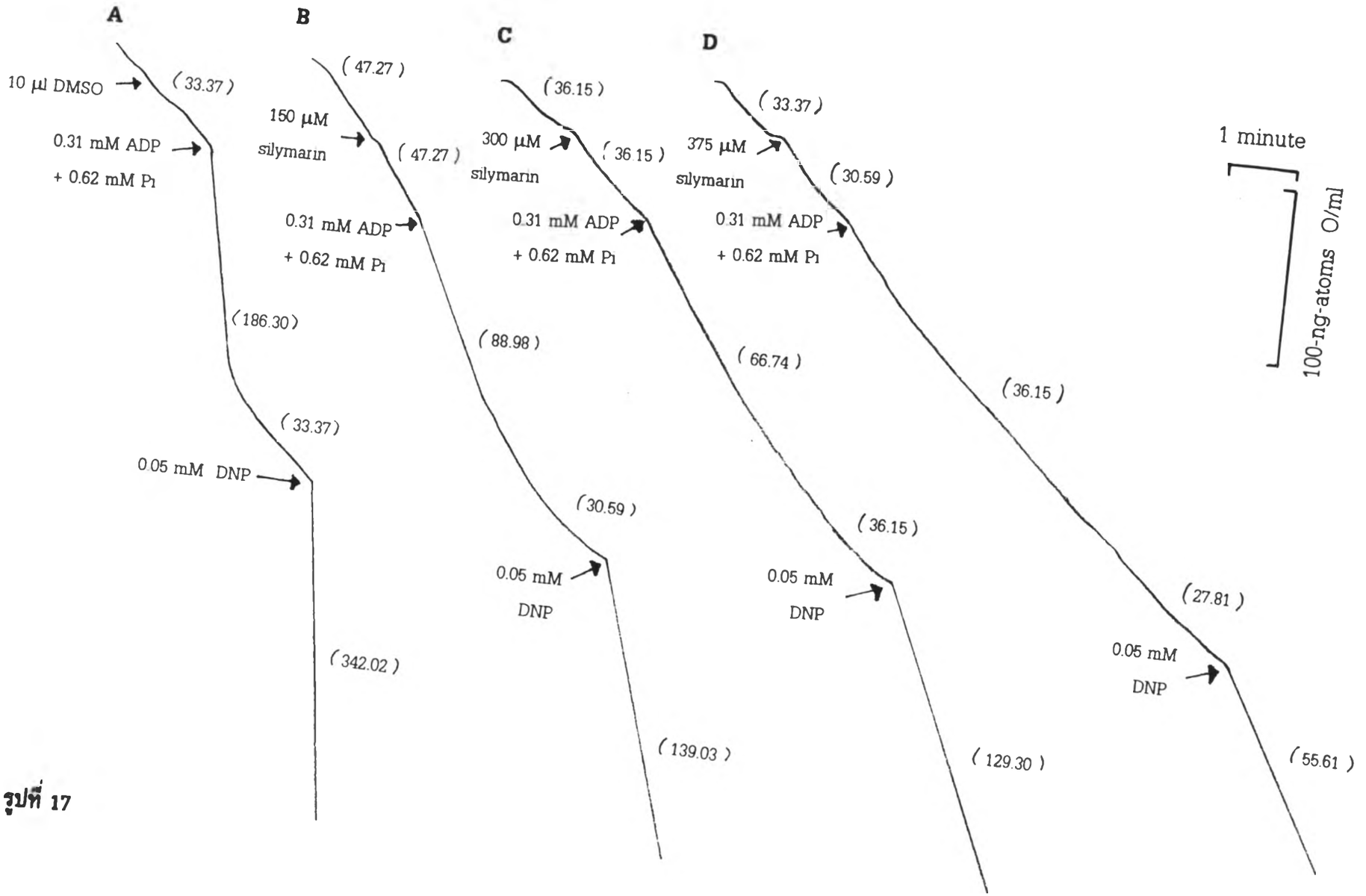
รูปและตารางประกอบผลการวิจัย

รูปที่ 17

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ silymarin ในขนาด 150 , 300 , 375 μM ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate , 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.52 มก.โปรตีน / มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP และ silymarin ความเข้มข้น 150 , 300 , 375 μM ส่วนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 มคล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน / มล. / นาที


A
B
C
D
10 µl DMSO
(33.37)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(186.30)
(33.37)
0.05 mM DNP
(342.02)
150 µM
silymarin
(47.27)
(47.27)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(88.98)
(30.59)
0.05 mM
DNP
(139.03)
300 µM
silymarin
(36.15)
(36.15)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(66.74)
(36.15)
0.05 mM
DNP
(129.30)
375 µM
silymarin
(33.37)
(30.59)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(36.15)
(27.81)
0.05 mM
DNP
(55.61)
1 minute
100-ng-atoms O/ml

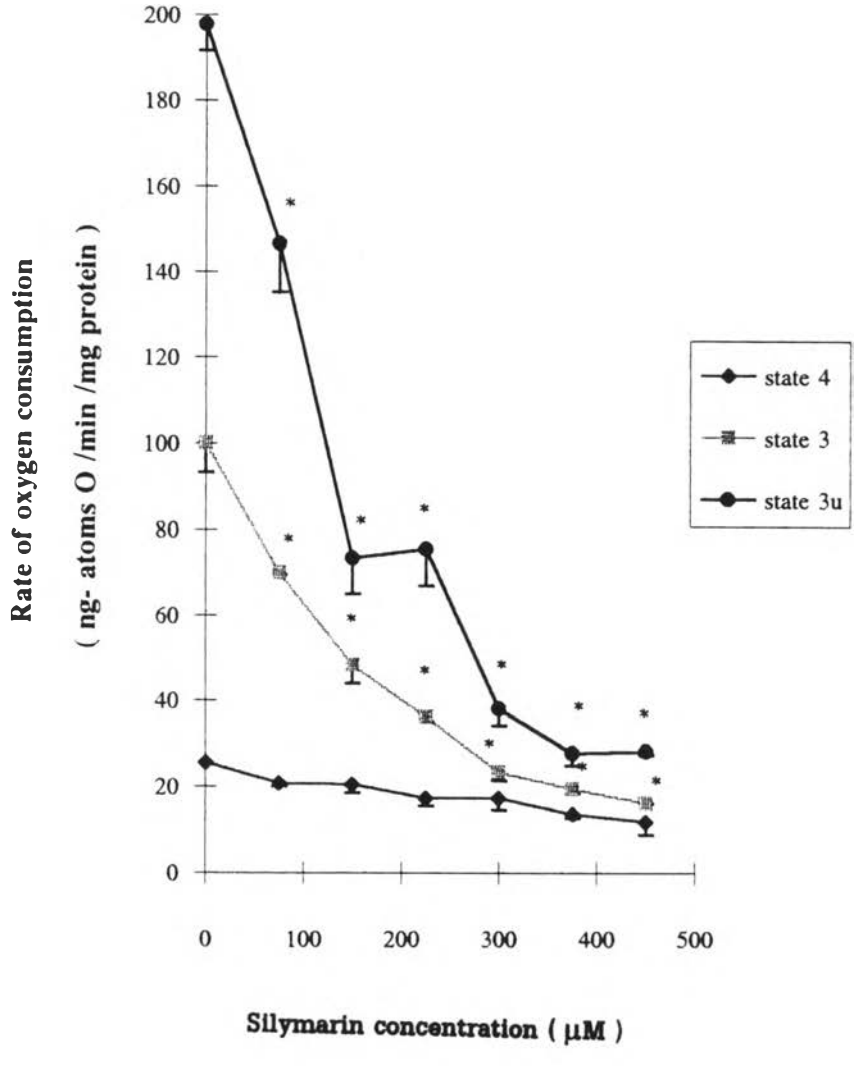
รูปที่ 17

รูปที่ 18

Dose-response curve ของ silymarin ที่มีต่อ state 4 , 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate , 13.02 mM sucrose , 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.30 มก.โปรตีน / มล. ความเข้มข้นของ silymarin ที่ใช้เติมได้แก่ 75 , 150 , 225 , 300 , 375 และ 450 μM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

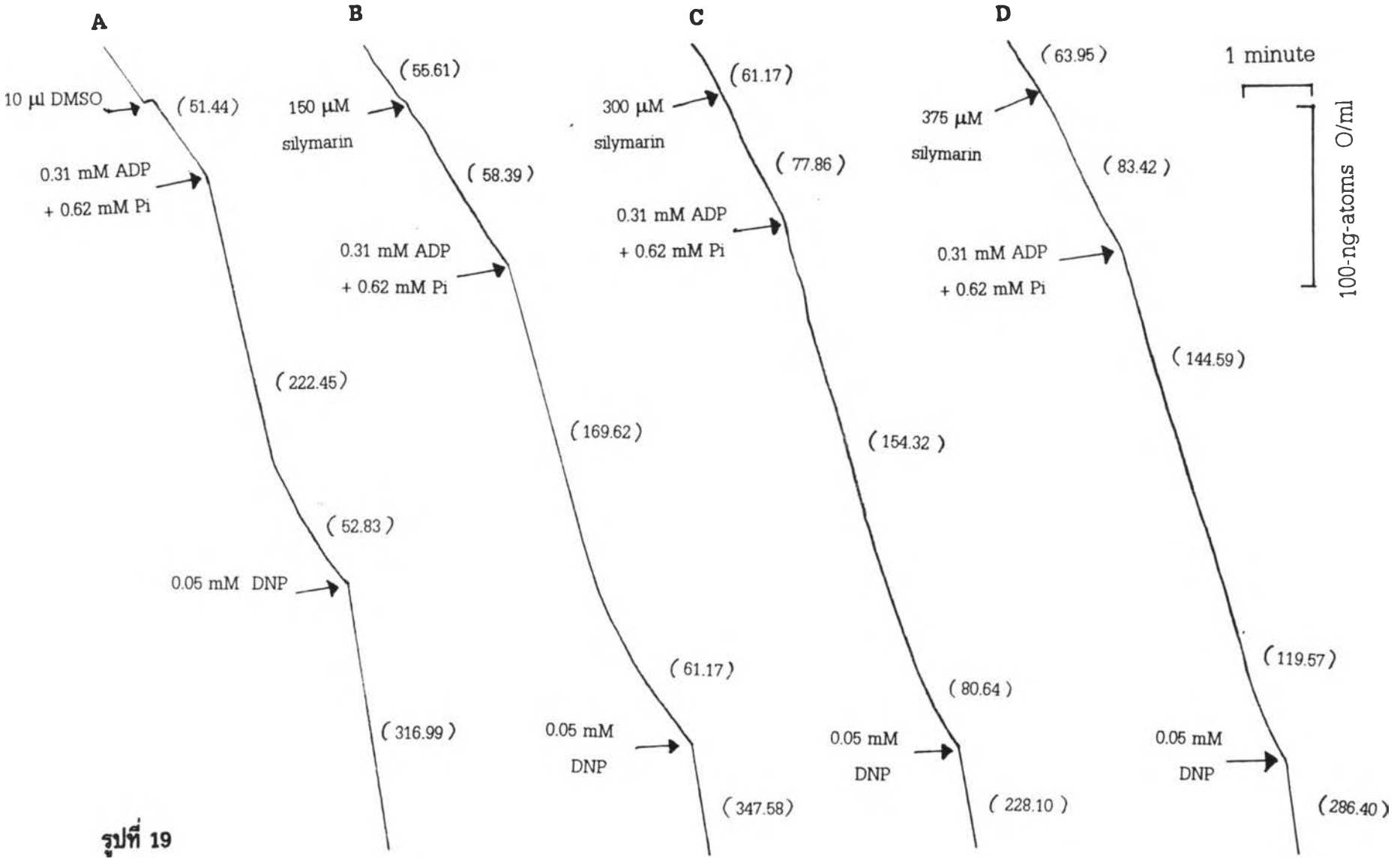
รูปที่ 18

รูปที่ 19

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ silymarin ในขนาด 150 , 300 , 375 μM ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM succinate , 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.63 มก.โปรตีน / มล. สวนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP และ silymarin ความเข้มข้น 150 , 300 , 375 μM สวนในกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 10 มคล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน / มล. / นาที


A
B
C
D
10 µl DMSO
(51.44)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(222.45)
(52.83)
0.05 mM DNP
(316.99)
150 µM
silymarin
(55.61)
(58.39)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(169.62)
(61.17)
0.05 mM
DNP
(347.58)
300 µM
silymarin
(61.17)
(77.86)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(154.32)
(80.64)
0.05 mM
DNP
(228.10)
375 µM
silymarin
(63.95)
(83.42)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(144.59)
(119.57)
0.05 mM
DNP
(286.40)
1 minute
100-ng-atoms O/ml

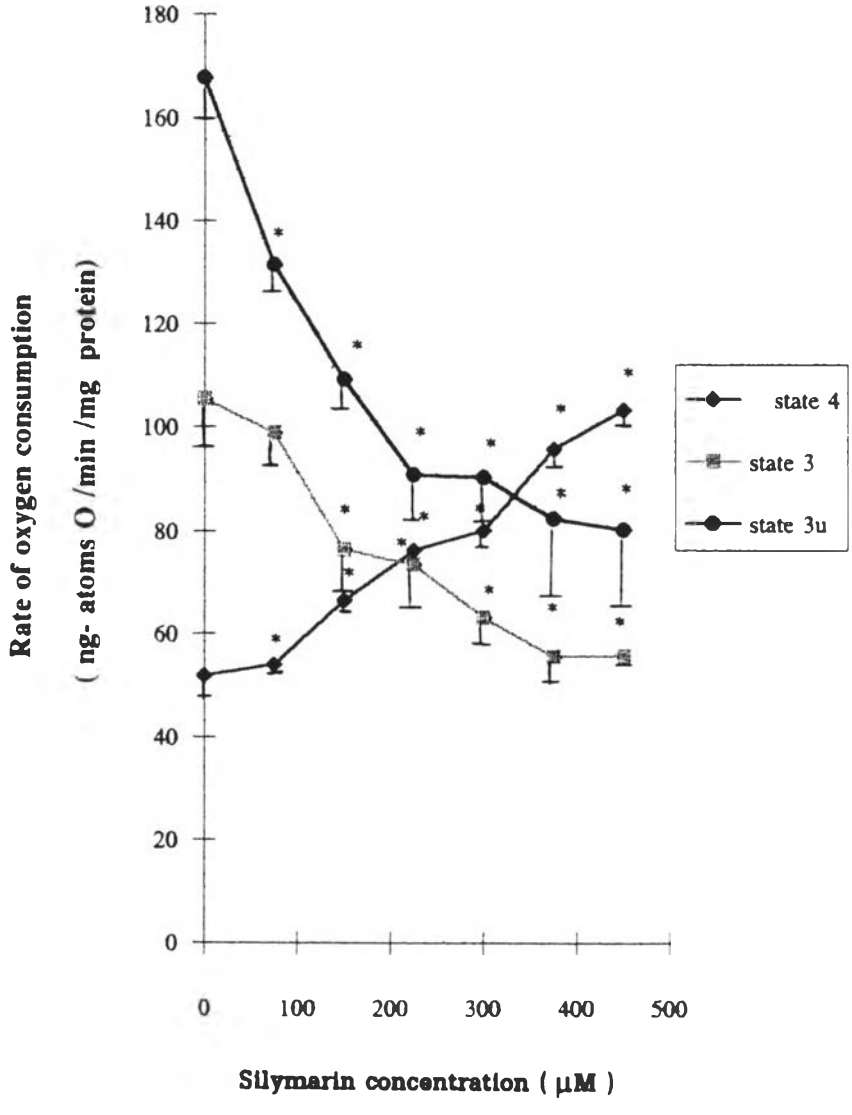
รูปที่ 19

รูปที่ 20

Dose-response curve ของ silymarin ที่มีต่อ state 4 , 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM succinate , 13.02 mM sucrose , 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.51 มก.โปรตีน / มล. ความเข้มข้นของ silymarin ที่ใช้เติมได้แก่ 75 , 150 , 225 , 300 , 375 และ 450 µM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 20

ตารางที่ 5

ผลของ silymarin ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราส่วน ADP/O เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็น substrates

Experiments	glutamate + malate		succinate	
	RCI	ADP/O	RCI	ADP/O
control (10 µl DMSO)	5.49±0.14	2.90±0.25	3.96±0.33	1.83±0.17
Silymarin 75 µM	3.75±0.01*	2.48±0.22	2.74±0.19*	1.79±0.25
Silymarin 150 µM	2.88±0.01*	2.23±0.35*	1.84±0.22*	1.59±0.22*
Silymarin 225 µM	1.95±0.11*	2.52±0.25*	1.71±0.14*	1.58±0.01*
Silymarin 300 µM	1.26±0.03*	2.03±0.32*	1.39±0.04*	1.17±0.22*

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate หรือ 5.21 mM succinate , 13.02 mM sucrose , 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.74 มก.โปรตีน / มล. เติม DMSO หรือ silymarin ในความเข้มข้นต่างๆ ลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียเป็นเวลานาน 1 นาที จากนั้นเติม ADP + Pi ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 6

ผลของ silymarin ต่อ state 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate , succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrates

substrate	rate of state 3u respiration (ng-atoms O/ min/ mg protein)		
	Control	300 μM Silymarin	1125 μM Silymarin
Glutamate + malate	177.29 ± 19.08	46.65 ± 1.01*	8.86 ± 1.40*
succinate	161.52 ± 9.12	112.12 ± 12*	45.78 ± 10.7*
ascorbate + TMPD	226 .33 ± 0.09	232.56 ± 10.14	175.21 ± 20.35

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate หรือ 5.21 mM succinate หรือ 2.08 mM ascorbate + 0.52 mM TMPD , 0.05 mM DNP , 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.43 มก. โปรตีน / มล. เติม DNP ลงไปใน chamber ก่อน จึงเติม DMSO หรือ silymarin แล้ว incubate นาน 1 นาที จึงใส่ substrate ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 7

ผลของ silymarin ต่อ state 3u respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH , succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrates

substrate	rate of state 3u respiration (ng-atoms O /min/ mg protein)		
	Control	300 μM Silymarin	1125 μM Silymarin
NADH	35.55 ± 9.72	27.19 ± 7.69	15.42 ± 4.44*
succinate	50.52 ± 7.10	48.62 ± 9.09	25.89 ± 6.86*
ascorbate + TMPD	163.65 ± 16.82	175.83 ± 25.97	171.42 ± 47.09

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ส่วนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 1.04 mM NADH หรือ 5.21 mM succinate หรือ 2.08 mM ascorbate + 0.52 mM TMPD , 0.05 mM DNP , 0.521 mM sucrose และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.42 มก.โปรตีน / มล. เติม silymarin ลงไป incubate นาน 1 นาที ก่อนเติม substrate ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

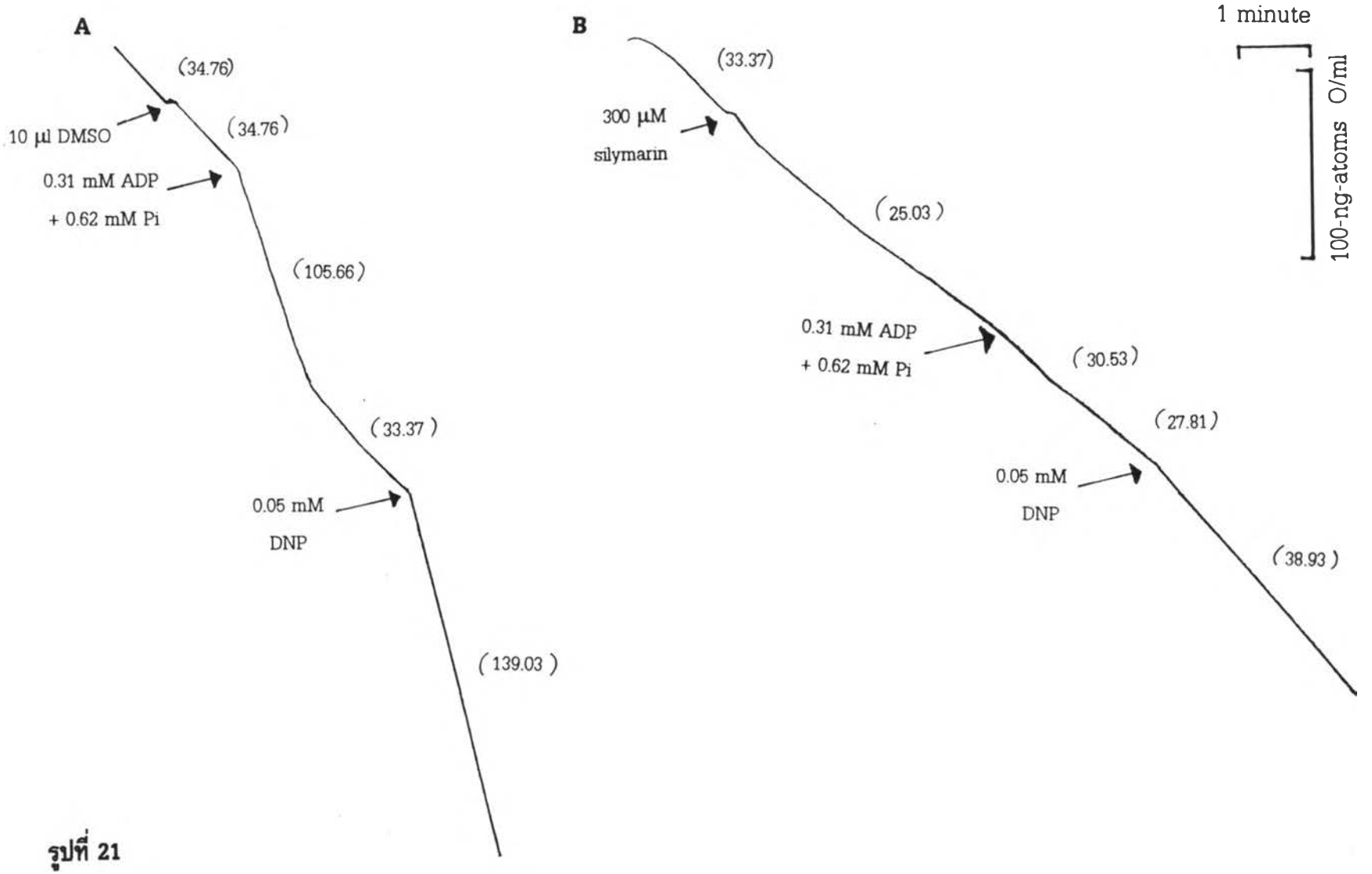
ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 21

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ silymarin ในขนาด 300 μM ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ β-hydroxybutyrate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM β-hydroxybutyrate ,13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรีย 1.25 มก. โปรตีน / มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ DMSO และ silymarin ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน / มล. / นาที


A
(34.76)
10 µl DMSO
(34.76)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(105.66)
(33.37)
0.05 mM
DNP
(139.03)
B
1 minute
100-ng-atoms O/ml
(33.37)
300 µM
silymarin
(25.03)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(30.53)
(27.81)
0.05 mM
DNP
(38.93)

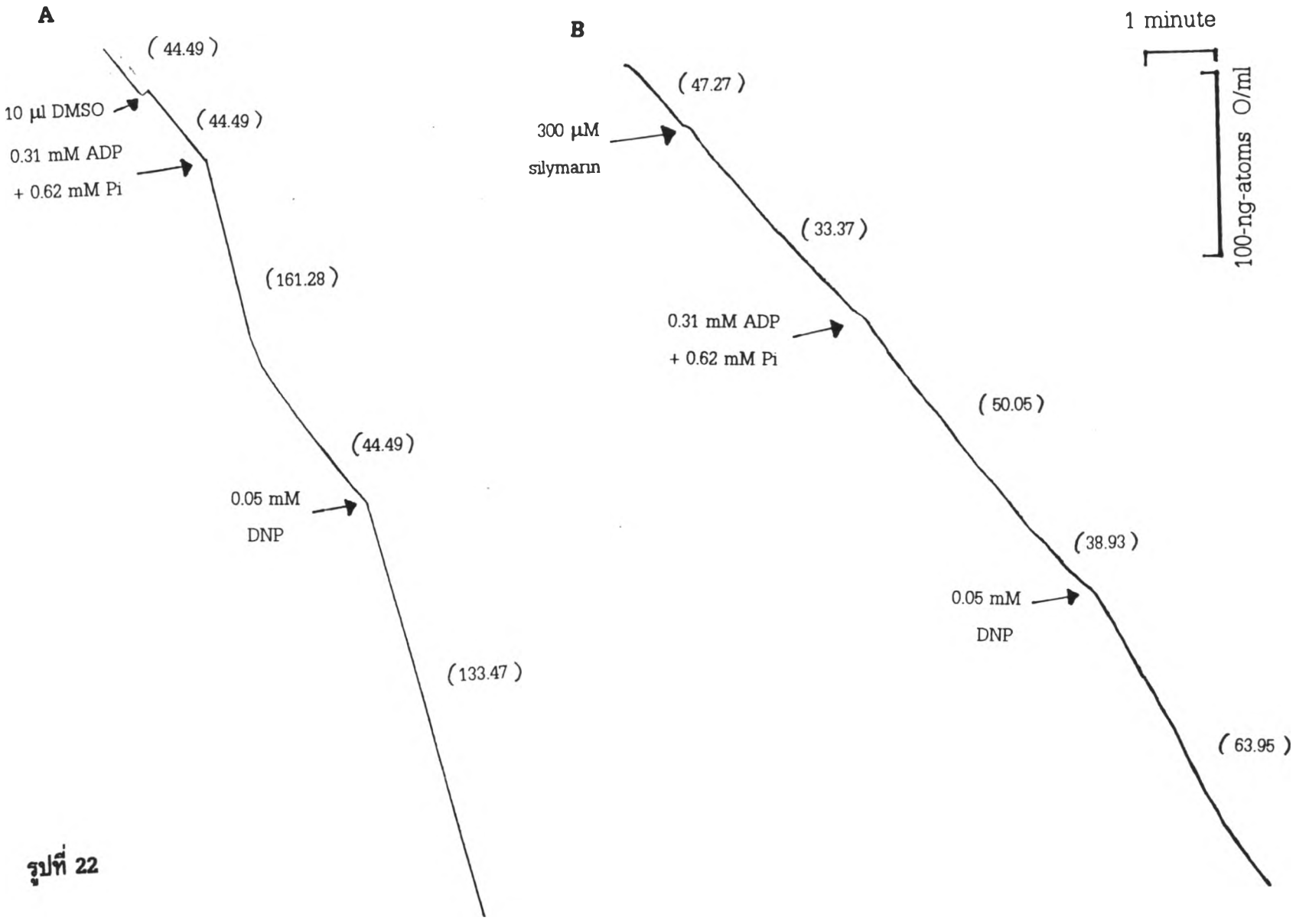
รูปที่ 21

รูปที่ 22

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ silymarin ในขนาด 300 μM ที่มีต่ออัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ α-ketoglutarate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM α-ketoglutarate , 13.02 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP และไมโตคอนเดรีย 1.25 มก. โปรตีน / มล. สวนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ DMSO และ silymarin ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน / มล. / นาที


A
(44.49)
10 µl DMSO
(44.49)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(161.28)
(44.49)
0.05 mM
DNP
(133.47)
B
1 minute
100-ng-atoms O/ml
(47.27)
300 µM
silymarin
(33.37)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(50.05)
(38.93)
0.05 mM
DNP
(63.95)

รูปที่ 22

ตารางที่ 8

ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อ state 3 , 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

Experiment	rate of respiration (ng-atoms O /min/mg protein)	
	State 3	State 3u
pH 6.8		
control	66.63±4.27	71.66±7.40
300 μM silymarin	23.43±1.31 * (64.81%)	34.94±2.75 * (51.24%)
pH 7.2		
control	74.24±9.45	100.47±2.82
300 μM silymarin	21.38±1.16 * (71.20%)	35.30±1.45 * (64.87%)
pH 7.6		
control	60.63±8.90	102.27±5.81
300 μM silymarin	23.87±2.24 * (60.63%)	47.83±3.85 * (53.23%)

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 6.8 , 7.2 , 7.6 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate ,0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP , 13.02 mM sucrose ,และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.90 มก.โปรตีน / มล. สวนประกอบอื่นๆที่เติมตามลงไป คือ DMSO และ silymarin ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

คาที่แสดงในตารางเป็นคาเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของคาเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง และตัวเลขในวงเล็บแสดงเปอร์เซนต์การยับยั้งการหายใจของไมโตคอนเดรีย

ตารางที่ 9

ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ในการยับยั้งการหายใจ state 4, 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

Experiments	rate of respiration (ng-atoms O /min/ mg protein)		
	state 4	state 3	state 3u
Control	19.11 ±0.64	99.03 ±9.07	145.73 ±12.50
300 μM Silymarin	17.36 ±0.51	23.86 ±1.64	44.52 ±4.82
DTT+300 μM Silymarin	18.42 ±3.48	25.10 ±3.89	47.17 ±3.138

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate , 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP , 13.02 mM sucrose ,และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย1.25 มก.โปรตีน / มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไป คือ 1.05 mM DTT และ 300 μM silymarin ซึ่งจะต้อง incubate กับไมโตคอนเดรีย นาน 1 นาที ก่อนเติม glutamate + malate, ADP+Pi , DNP ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ตารางที่ 10

ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ในการกระตุ้นการหายใจ state 4, การยับยั้งการหายใจ, 3 และ 3u respiration ของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

Experiment	rate of respiration (ng-atoms O /min/ mg protein)		
	state 4	state 3	state 3u
Control	25.98 ±0.84	102.44 ±16.13	164.18 ±9.68
300 μM Silymarin	37.37 ±3.41	51.39 ±9.04	119.97 ±9.84
DTT+300 μM Silymarin	38.67 ±3.488	55.14 ±8.44	126.41 ±4.38

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM succinate ,13.02 mM sucrose , 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP , และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.25 มก. โปรตีน / มล. สวนประกอบอื่นที่เติมตามลงไป คือ 1.05 mM DTT และ 300 μM silymarin ซึ่งจะต้อง incubate กับไมโตคอนเดรีย นาน 1 นาที ก่อนเติม succinate , ADP+Pi , DNP ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 23

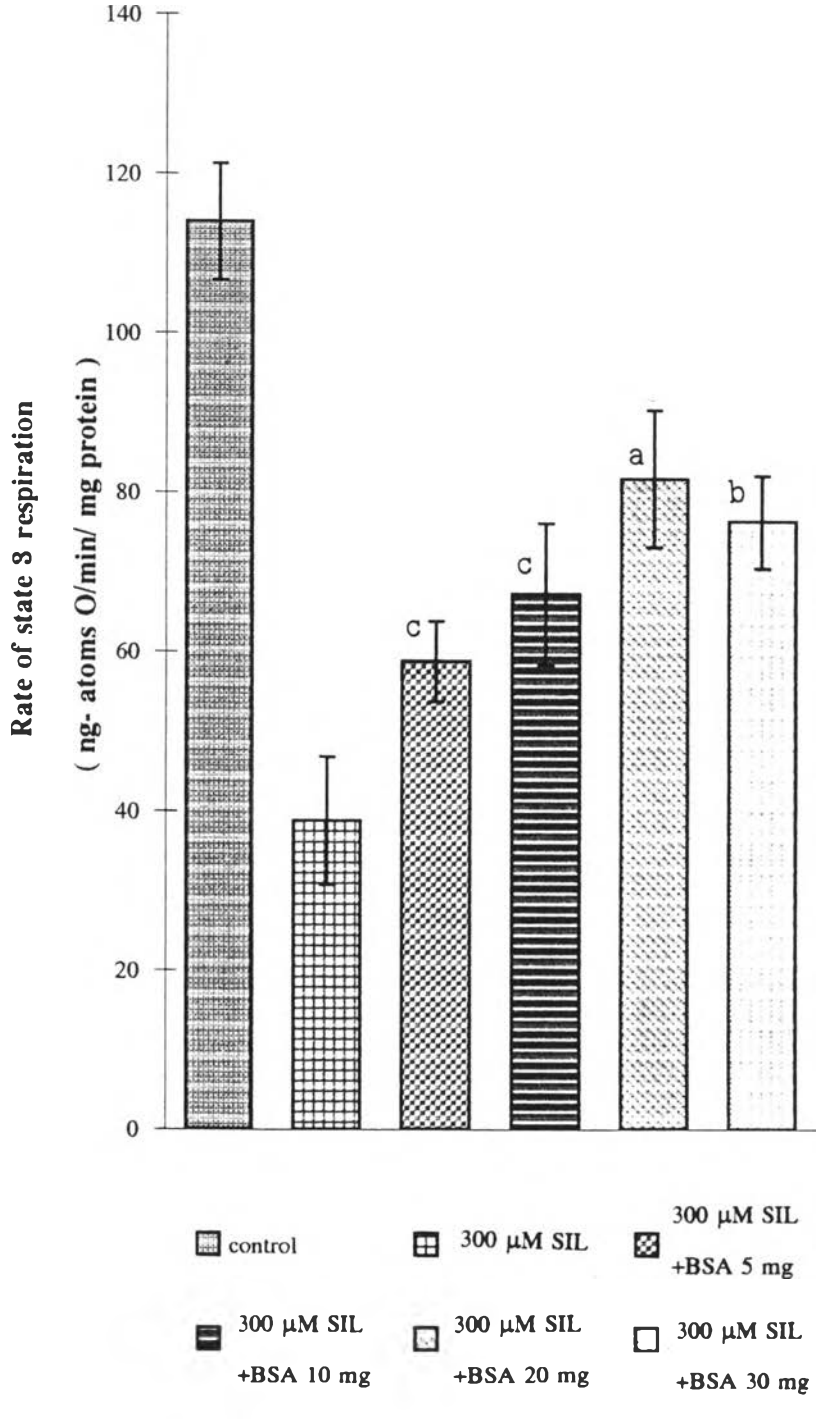
ผลของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 35.05 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.75 mM $MgCl_2$, 80.62 mM KCl , 5.15 mM potassium glutamate + 5.15 mM potassium malate, 12.89 mM sucrose, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.61 มก.โปรตีน / มล. สวนประกอบอื่นที่เติมตามลงไป คือ BSA ขนาด 5, 10, 20, และ 30 มก., 300 μM silymarin ปริมาตรทั้งหมด 1.94 มล. อุณหภูมิ 37 °C เติม silymarin หลังจากเติม BSA 1 นาทีและเติม ADP + Pi หลังจาก silymarin 1 นาที

a : $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ 300 μM Silymarin

b : $p = 0.05$

c : $p > 0.05$


Rate of state 3 respiration
(ng- atoms O/min/ mg protein)
140
120
100
80
60
40
20
0
a
b
c
c
control
300 µM SIL
300 µM SIL
+BSA 5 mg
300 µM SIL
+BSA 10 mg
300 µM SIL
+BSA 20 mg
300 µM SIL
+BSA 30 mg

รูปที่ 23

ตารางที่ 11

ผลของ silymarin ต่อการกระตุ้น ATPase activity ของไมโตคอนเดรียเมื่อมีหรือไม่มี DNP

Experiments	Pi liberated (μmoles /mg protein /10 min)
No DNP	
control (DMSO)	0.135 ±0.06
300 μM silymarin	0.475 ±0.06*
600 μM silymarin	0.955 ±0.08*
With 0.1 mM DNP	
control (DMSO)	5.25 ±0.36
300 μM silymarin	4.38 ±0.25*
600 μM silymarin	2.80 ±0.55*
10 mcg. oligomycin	0.955 ±0.21*

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

สวนประกอบปฏิกิริยา : 35.30 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.77 mM $MgCl_2$, 81.19 mM KCl , 16.78 mM sucrose, และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.04 มก.โปรตีน / มล., DMSO , silymarin , DNP และ oligomycin ดังแสดงในตาราง และ 5.03 mM ATP ปริมาตรทั้งหมด 2.98 มล. อุณหภูมิ 37 °C เติมตัวยาต่างๆลงไปเพื่อ preincubate กับไมโตคอนเดรียตามลำดับ ดังแสดงในตาราง การเติมตัวยาแต่ละครั้งเว้นเวลา 1 นาที เติม ATP หลังจากเติมตัวยาต่างๆครบแล้วเป็นเวลา 2 นาที

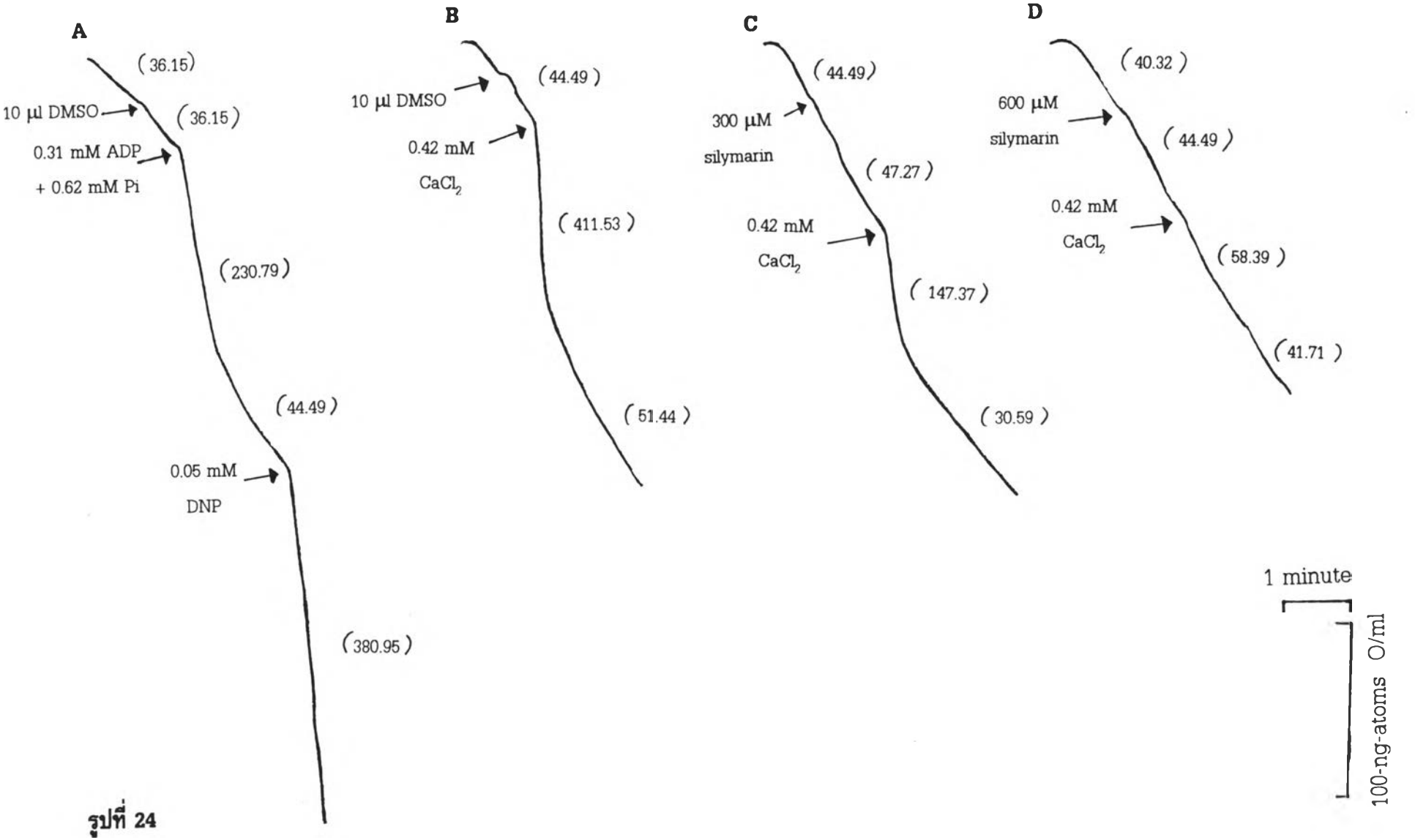
ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

รูปที่ 24

ตัวอย่าง tracings แสดงผลของ silymarin ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของ ไมโตคอนเดรียโดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

สวนประกอบปฏิกิริยา : 37.50 mM HEPES buffer pH 7.2 , 1.88 mM $MgCl_2$, 86.25 mM KCl , 5.21 mM potassium glutamate + 5.21 mM potassium malate , 0.26 Pi , 13.02 mM sucrose และไมโตคอนเดรีย 1.84 มก. โปรตีน / มล. สวนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi , 0.05 mM DNP , DMSO , $CaCl_2$ และ silymarin ความเข้มข้น 300 , 600 µM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน / มล. / นาที


A
(36.15)
10 µl DMSO
(36.15)
0.31 mM ADP
+ 0.62 mM Pi
(230.79)
(44.49)
0.05 mM
DNP
(380.95)
B
(44.49)
10 µl DMSO
0.42 mM
CaCl2
(411.53)
(51.44)
C
(44.49)
300 µM
silymarin
(47.27)
0.42 mM
CaCl2
(147.37)
(30.59)
D
(40.32)
600 µM
silymarin
(44.49)
0.42 mM
CaCl2
(58.39)
(41.71)
1 minute
100-ng-atoms O/ml

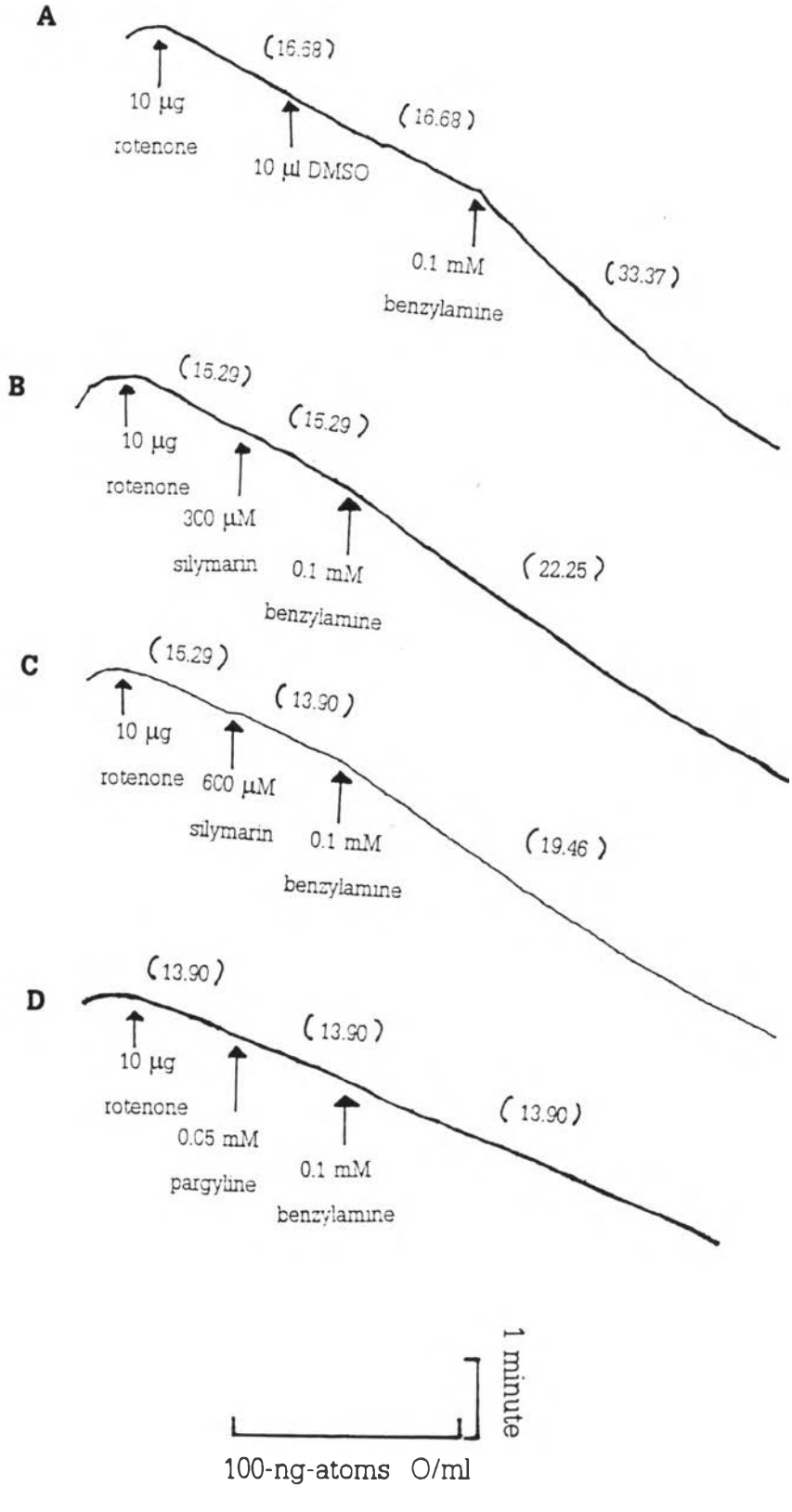
รูปที่ 24

รูปที่ 25

แสดงผลของ silymarin ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโตคอนเดรีย

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.023 M KH_2PO_4 pH 7.2 , 13.02 mM sucrose , 10 µg rotenone และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.92 มก.โปรตีน / มล. ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปอีก ดังแสดงในรูป คือ DMSO , benzylamine , silymarin และ pargyline ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 °C

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในภาวะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บและมีหน่วยเป็นจำนวน นนอ. ออกซิเจน / มล. / นาที


A
(16.68)
10 µg
rotenone
10 µl DMSO
(16.68)
0.1 mM
benzylamine
(33.37)
B
(15.29)
10 µg
rotenone
(15.29)
300 µM
silymarin
0.1 mM
benzylamine
(22.25)
C
(15.29)
10 µg
rotenone
(13.90)
600 µM
silymarin
0.1 mM
benzylamine
(19.46)
D
(13.90)
10 µg
rotenone
(13.90)
0.05 mM
pargyline
0.1 mM
benzylamine
(13.90)
1 minute
100-ng-atoms O/ml

รูปที่ 25