

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

1. ผลของ quercetin และ naringenin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 24 แสดง control respiratory response ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ตัวเลขที่กำกับอยู่ทุกระยะของ oxygraph tracing คือ ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะ (state) นั้น มีหน่วยเป็น จำนวน n atoms O/min/mg protein ส่วนประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยา ได้แก่ ไมโตคอนเดรียซึ่ง incubate อยู่ใน incubation medium โดยที่มี glutamate + malate เป็นซับสเตรตในปริมาณที่มากเกินไปที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ตามรูปอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะแรกนี้มีค่า 10.27 n atoms O/min/mg protein ซึ่งอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียยังต่ำอยู่ ระยะนี้เรียกว่า state 4 respiration หรือเป็นระยะที่ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนในสภาวะที่มีส่วนประกอบสำคัญในปฏิกิริยา ได้แก่ ออกซิเจน และ ซับสเตรต เมื่อเติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ลงไป จะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น 54.76 n atoms O/min/mg protein ซึ่งระยะนี้จะเรียกว่า state 3 respiration หรือ active state เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 นาที อัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเป็น 10.27 n atoms O/min/mg protein นั่นคือ กลับสู่ state 4 respiration ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อ ADP ถูก phosphorylate ไปเป็น ATP จนหมด เรียกการที่อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียถูกควบคุมด้วยการเติม ADP ลงไปนี้ว่า ไมโตคอนเดรียมีการควบคุมการหายใจ (respiratory control) และถือว่าเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของ ไมโตคอนเดรีย คือ ถ้าไม่มี ADP อัตราการใช้ออกซิเจนจะช้า (state 4) ถ้ามี ADP อัตราการใช้ออกซิเจนจะเร็วขึ้น (state 3) โดยสามารถคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ หรือ Respiratory Control Index (RCI) ได้ จากอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3หารด้วย อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 ดังนั้น RCI ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้ (ตามรูปที่ 24) จึงมีค่าเท่ากับ  $54.76 / 10.27 = 5.33$

สารเคมีบางอย่าง เช่น DNP สามารถทำให้การควบคุมการหายใจของไมโตคอนเดรียเสียไปได้ โดย DNP สามารถกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้คล้าย state 3 respiration แม้ว่าจะไม่มี ADP + Pi ก็ตาม (ไม่มีการสังเคราะห์ ATP) ทำให้ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วต่อเนื่องกันจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction mixture ระยะนี้เรียกว่า state 3u respiration จากรูปที่ 24 แสดงให้เห็นว่า หลังจากเมื่อเติม DNP ลงไป อัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะเพิ่มเป็น 71.87 n atoms O/min/mg protein นั่นคือ DNP ทำให้เสียสภาวะการควบคุม

กันของกระบวนการ oxidative และกระบวนการ phosphorylation ทำให้เกิดภาวะ uncoupling เรียกว่าที่มีคุณสมบัติเช่นนี้ว่า uncoupler หรือ uncoupling agent

### 1.1 ผลของ quercetin ขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

ผลของ quercetin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต ทำการศึกษาโดยเติม glutamate + malate เป็นซับสเตรต ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียอยู่ จากนั้นเติม quercetin ขนาดต่างๆลงไป พบว่า

quercetin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration ได้ ซึ่งจากรูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่า quercetin ที่ขนาด 10, 20, 50, 100, 150 และ 200  $\mu\text{g}$  (คิดเป็นความเข้มข้น 15.61, 31.22, 78.04, 156.09, 234.13 และ 312.17  $\mu\text{M}$ ) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ control คือ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลาย quercetin ในการวิจัยนี้ ซึ่ง DMSO ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย และหลังจากที่เติม ADP + Pi ลงใน reaction mixture ทำให้เกิด state 3 respiration พบว่า quercetin ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน active state นี้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ตามขนาด และทำให้ค่า RCI ลดลงตามขนาดที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 26

ผลของ quercetin ต่อ state 4 respiration ในช่วงขนาด 10 - 200  $\mu\text{g}$  ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือมีผลให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ลดลง คิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการใช้ออกซิเจน ตั้งแต่  $0.05 \pm 0.00\%$  ถึง  $17.82 \pm 4.32\%$  แต่ทุกขนาด ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในรูปที่ 27 ซึ่งแสดง dose-response relationship curve นั้น พบว่าค่า  $\text{IC}_{50}$  ของ quercetin ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต จากการคำนวณมีค่าเป็น 44.69  $\mu\text{M}$

### 1.2 ผลของ naringenin ขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

พบว่า naringenin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration ได้ ซึ่งจากรูปที่ 28 แสดงให้เห็นว่า naringenin ที่ขนาด 15 - 200  $\mu\text{g}$  (คิดเป็นความเข้มข้นความเข้มข้น 26.01 - 364.20  $\mu\text{M}$ ) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเล็กน้อย (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อเทียบกับ control คือ DMSO และหลังจากที่เติม ADP + Pi ลงใน reaction mixture ทำให้เกิด state 3 respiration แล้วนั้น พบว่า naringenin ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลง โดยที่ขนาด 80, 150 และ 200  $\mu\text{g}$  (156.09, 260.15 และ 364.20  $\mu\text{M}$ ) ทำให้

อัตราการใช้ออกซิเจนใน active state นี้ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนค่า RCI นั้นลดลงตามขนาดของ naringenin ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 29

สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ของ naringenin โดยเมื่อนำค่าเฉลี่ยมาคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการใช้ออกซิเจนจาก control มีค่าเป็น  $0.12 \pm 0.05\%$  ถึง  $9.33 \pm 2.44\%$  ที่ naringenin ขนาด  $15 - 150 \mu\text{g}$  ( $26.01 - 260.15 \mu\text{M}$ ) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคิดเป็น  $27.27 \pm 3.03\%$  ที่ขนาด  $200 \mu\text{g}$  ( $364.20 \mu\text{M}$ ) และ ฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของ naringenin นั้นเพิ่มขึ้นตามขนาดที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเป็น  $18.39 \pm 7.52\%$  ถึง  $83.66 \pm 1.38\%$  ในรูปที่ 30 ซึ่งแสดง dose-response relationship curve นั้น ค่า  $\text{IC}_{50}$  ของ naringenin ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ  $87.55 \mu\text{M}$

## 2. ผลของ quercetin และ naringenin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆของ ไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

รูปที่ 31 แสดง oxygraph tracing ปกติในการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต โดยมี rotenone ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ใน complex I ในปฏิกริยานี้เนื่องจากต้องการศึกษาผลของสารทดสอบต่อ complex II ในลูกโซ่การหายใจ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration นี้มีค่า  $18.82 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  ระยะเวลาต่อไปอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น  $56.47 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  เรียกว่า state 3 respiration หรือ active state เมื่อเติม  $0.3 \text{ M ADP} + 0.6 \text{ M Pi}$  ลงไป จะทำให้เกิดปฏิกริยาการสังเคราะห์ ATP ขึ้นแล้วอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะลดช้าลงเป็น  $20.53 \text{ n atoms O/min/mg protein}$  นั่นคือการกลับเข้าสู่ state 4 respiration เมื่อ ADP ถูกใช้หมดไปในการทำปฏิกริยา phosphorylation ค่า RCI ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต ตามรูปที่ 31 จึงมีค่าเท่ากับ  $56.47 / 20.53 = 2.75$  เมื่อเติม DNP ซึ่งสามารถกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียได้คล้าย state 3 respiration ทำให้ ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วต่อเนื่องกันจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction mixture ระยะนี้เรียกว่า state 3u respiration จากรูปที่ 31 แสดงให้เห็นว่า หลังจากเมื่อเติม DNP ลงไปอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้จะเพิ่มเป็น  $71.87 \text{ n atoms O /min/mg protein}$

**2.1 ผลของ quercetin ขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย**  
ผลของสารต่ออัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆของไมโตคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต ทำการศึกษาโดยมี quercetin ขนาดต่างๆ

quercetin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 respiration ได้ กล่าวคือ quercetin ที่ขนาด 10, 20, 50, 100 และ 150  $\mu\text{g}$  (15.61, 31.22, 78.04, 156.09 และ 234.13  $\mu\text{M}$ ) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ control แต่ quercetin ที่ขนาดสูงที่สุดที่ทำการศึกษ (200  $\mu\text{g}$ ) ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กรณีของ state 3 respiration พบว่า quercetin ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลง โดยที่ขนาด 20, 50, 100, 150 และ 200  $\mu\text{g}$  ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 32) และเมื่อนำค่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 หารด้วย อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration พบว่า quercetin ทำให้ค่า RCI ลดลงตามขนาดที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 33

สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ของ quercetin โดยเมื่อนำค่าเฉลี่ยมาคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการใช้ออกซิเจน พบว่ามีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามขนาด และมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่ขนาด 100, 150 และ 200  $\mu\text{g}$  (156.09, 234.13 และ 312.17  $\mu\text{M}$ ) ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของ quercetin พบว่าทุกขนาดสามารถยับยั้ง state 3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รูปที่ 34 ซึ่งแสดง dose-response relationship curve นั้น พบว่าค่า  $\text{IC}_{50}$  ของ quercetin ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 26.97  $\mu\text{M}$

## **2.2 ผลของ naringenin ขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย**

พบว่า naringenin ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4 และ state 3 respiration อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ control (รูปที่ 35) อย่างไรก็ตาม naringenin ทำให้ค่า RCI ลดลงตามขนาดของ naringenin ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 36

รูปที่ 37 แสดง dose-response relationship curve ของ naringenin ต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจน เทียบกับ control พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ของ naringenin นั้นเพิ่มขึ้นตามขนาดที่เพิ่มขึ้น และค่า  $\text{IC}_{50}$  ของ naringenin ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 380.72  $\mu\text{M}$

### 3. ผลของ quercetin และ naringenin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP

#### 3.1 ผลของ quercetin

##### 3.1.1 ผลของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ทำการศึกษาผลของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นโดย DNP ทั้งการใส่ quercetin ก่อนและหลัง DNP พบว่าเมื่อเติม quercetin ลงไปทั้งก่อนและหลัง DNP นั้น quercetin ทุกขนาดมีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นกัน ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u respiration นั้นเพิ่มขึ้นตามขนาดที่เพิ่มขึ้น ที่ขนาดต่ำสุดที่ทำการศึกษาคือ  $10 \mu\text{g}$  ( $15.61 \mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ได้  $15.04 \pm 0.92 \%$  และ  $22.75 \pm 2.56 \%$  เมื่อใส่ quercetin ก่อนและหลัง DNP ตามลำดับ เมื่อเพิ่มขนาดของ quercetin จนถึงขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ  $200 \mu\text{g}$  ( $312.17 \mu\text{M}$ ) พบว่า quercetin สามารถยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ได้ถึง  $86.77 \pm 0.82 \%$  และ  $91.56 \pm 0.72 \%$  เมื่อใส่ quercetin ก่อนและหลัง DNP ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการใส่สารทดสอบก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย DNP พบว่าที่ขนาด  $20 \mu\text{g}$  ( $31.22 \mu\text{M}$ ) นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ของร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u เมื่อใส่ quercetin ก่อนและหลัง DNP ดังแสดงผลในรูปที่ 38 และ 39 สำหรับค่า  $IC_{50}$  จาก dose-response relationship curve ในการยับยั้ง state 3u respiration ของ quercetin เมื่อใส่ก่อนและหลังกระตุ้นการใช้ออกซิเจนด้วย DNP นั้นต่างกันเล็กน้อย คือ มีค่า  $68.11 \mu\text{M}$  เมื่อใส่ quercetin ก่อน DNP และมีค่าเป็น  $45.81 \mu\text{M}$  เมื่อใส่ quercetin หลังจากใส่ DNP

##### 3.1.2 ผลของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ทำการศึกษาผลของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นโดย uncoupler ทั้งการใส่ quercetin ก่อน และหลัง DNP พบว่าเมื่อเติม quercetin ลงไปทั้งก่อนและหลังนั้น ทุกขนาดมีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นกัน ซึ่งเมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u respiration ดังแสดงผลในรูปที่ 40 และ 41 พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ของ quercetin นั้นเพิ่มขึ้นตามขนาด และที่ขนาด  $20 \mu\text{g}$  ( $31.22 \mu\text{M}$ ) นั้น ร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u เมื่อใส่ quercetin ก่อนและหลัง DNP มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับค่า  $IC_{50}$  ในการยับยั้ง state 3u respiration

ของ quercetin เมื่อใส่ก่อนและหลังกระตุ้นการใช้ออกซิเจนด้วย DNP นั้นต่างกันเล็กน้อย คือ มีค่า 62.39  $\mu\text{M}$  เมื่อใส่ quercetin ก่อน DNP และ มีค่าเป็น 50.03  $\mu\text{M}$  เมื่อใส่ quercetin หลังจากใส่ DNP

### 3.2 ผลของ naringenin

#### 3.2.1 ผลของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ทำการศึกษาผลของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นการหายใจโดย uncoupler ทั้งการใส่ naringenin ก่อน และหลัง DNP พบว่าเมื่อเติม naringenin ลงไปทั้งก่อนและหลังนั้น naringenin ทุกขนาดมีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u ได้เช่นกัน แต่มีความแตกต่างกันในกรณีที่ได้ใส่ naringenin ก่อนหรือหลัง DNP โดยที่ขนาด 30  $\mu\text{g}$  (52.03  $\mu\text{M}$ ) และ 50  $\mu\text{g}$  (104.06  $\mu\text{M}$ ) นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u respiration ดังแสดงผลในรูปที่ 42 และ 43 พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ของ naringenin นั้นเพิ่มขึ้นตามขนาด สำหรับค่า  $\text{IC}_{50}$  จาก dose-response relationship curve ในการยับยั้ง state 3u respiration ของ naringenin เมื่อใส่ก่อนและหลังกระตุ้นการใช้ออกซิเจนด้วย DNP นั้นมีค่านั้นต่างกัน คือ มีค่า 209.86  $\mu\text{M}$  เมื่อใส่ naringenin ก่อน DNP และ มีค่าเป็น 166.98  $\mu\text{M}$  เมื่อใส่ naringenin หลังจากใส่ DNP

#### 3.2.2 ผลของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ทำการศึกษาผลของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นโดย uncoupler ทั้งการใส่ naringenin ก่อน และหลัง DNP พบว่าเมื่อเติม naringenin ลงไปทั้งก่อนและหลังนั้น ทุกขนาดมีผลยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นกัน ซึ่งเมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วง state 3u respiration ดังแสดงผลในรูปที่ 44 และ 45 พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ของ naringenin นั้นเพิ่มขึ้นตามขนาด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกรณีที่ได้ใส่ naringenin ก่อนและหลัง DNP สำหรับค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้ง state 3u respiration ของ naringenin เมื่อใส่ก่อนและหลังกระตุ้นการใช้ออกซิเจนด้วย DNP นั้นจากการคำนวณพบว่ามีความต่างกัน คือ มีค่าเป็น 148.97  $\mu\text{M}$  เมื่อใส่ naringenin ก่อน DNP และ มีค่า 171.35  $\mu\text{M}$  เมื่อใส่ naringenin หลังจากใส่ DNP

### 4. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย

#### 4.1 ผลของ quercetin ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

จากรูปที่ 46 แสดงผลของ quercetin ขนาดต่างๆ (10 - 200  $\mu\text{g}$ ) ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบผลกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase ทำการศึกษาโดยวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ATPase ในการสลาย ATP พบว่า DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารทดสอบนั้นไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และ quercetin ทุกขนาดที่ทำการศึกษามีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้เล็กน้อย (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม DMSO (non DMSO) โดยมีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น สำหรับ DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ATPase activity พบว่ามีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเติม oligomycin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase พบว่าทำให้ผลการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ของ DNP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.2 ผลของ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

จากรูปที่ 47 แสดงผลของ naringenin ขนาดต่างๆ (15 - 200  $\mu\text{g}$ ) ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase และเปรียบเทียบผลกับ DNP ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี oligomycin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ATPase ทำการศึกษาโดยวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ATPase ในการสลาย ATP พบว่า DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย naringenin ในการศึกษาไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ ATPase เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (non DMSO) พบว่า naringenin มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้เล็กน้อย (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) โดยมีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น สำหรับ DNP ซึ่งเป็นสาร uncoupler พบว่ามีผลทำให้ปริมาณ Pi ที่ปลดปล่อยจากปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และ เมื่อเติม oligomycin พบว่าทำให้ผลการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ของ DNP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นกัน

### 5. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเกิด lipid peroxidation ของไมโทคอนเดรีย

#### 5.1 ผลของ quercetin ต่อการเกิด lipid peroxidation

จากรูปที่ 48 แสดงผลของ quercetin ขนาดต่างๆ ต่อการเกิด lipid peroxidation ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ascorbate กับ ferrous sulfate ของไมโทคอนเดรีย ทำการศึกษาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid แล้วให้สีชมพูเกิดขึ้น พบว่า quercetin ทุกขนาดตั้งแต่ 10 - 200  $\mu\text{g}$  (คิดเป็นความเข้มข้น 9.58  $\mu\text{M}$  ถึง 191.69  $\mu\text{M}$ ) สามารถยับยั้งการ

เกิด lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กล่าวคือ เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วคิดเป็นค่าการเกิด lipid peroxidation คือ  $0.249 \pm 0.035$  ถึง  $0.159 \pm 0.007$  unit/mg protein หรือคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้อยู่ในช่วงประมาณ 88 – 95 % เช่นเดียวกับกับ EDTA ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ คิดเป็น  $0.277 \pm 0.080$  unit / mg protein โดยคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ประมาณ 90 %

## 5.2 ผลของ naringenin ต่อการเกิด lipid peroxidation

จากรูปที่ 49 แสดงผลของ naringenin ขนาดต่างๆ ต่อการเกิด lipid peroxidation ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ascorbate กับ ferrous sulfate ของไมโตคอนเดรีย ทำการศึกษาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid แล้วให้สีชมพูเกิดขึ้น พบว่า naringenin ทุกขนาดตั้งแต่ 15 - 200  $\mu\text{g}$  (คิดเป็นความเข้มข้น 15.97  $\mu\text{M}$  ถึง 223.64  $\mu\text{M}$ ) มีผลยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับกับ EDTA ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ และฤทธิ์ในการยับยั้งนี้เพิ่มขึ้นตามขนาดของ naringenin ที่สูงขึ้นด้วย กล่าวคือ เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วคิดเป็น  $1.511 \pm 0.193$  ถึง  $0.231 \pm 0.051$  unit/mg protein เมื่อคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้มีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 48 – 92 % ส่วนหลอดทดลองที่ใส่ EDTA นั้น มีค่าเป็น  $0.260 \pm 0.086$  unit/mg protein ซึ่งคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ประมาณ 90 %

## 6. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) ของไมโตคอนเดรีย

### 6.1 ผลของ quercetin

#### 6.1.1 ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง

จากรูปที่ 50 แสดงผลของ quercetin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO แบบไม่จำเพาะเจาะจง ทำการศึกษาโดยเติมซับสเตรตสำหรับทั้ง MAO-A และ MAO-B คือ 0.1 M tyramine HCl ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรีย และ rotenone อยู่ โดย rotenone จะไปยับยั้งการออกซิไดส์ endogenous substrates ของไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปเกิดจาก monoamine oxidase ออกซิไดส์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว พบว่า quercetin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ในการออกซิไดส์ tyramine ซึ่งเป็นซับสเตรต แบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งนี้เพิ่มขึ้นตามขนาดของ quercetin ที่สูงขึ้นด้วย โดยที่ขนาดต่ำสุดคือ 10  $\mu\text{g}$  (15.61  $\mu\text{M}$ ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ MAO ได้  $20.84 \pm 1.72$  % และเมื่อเพิ่ม



ขนาดจนถึงขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (312.17  $\mu\text{M}$ ) ฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO ก็เพิ่มขึ้นเป็นสามารถยับยั้งได้  $65.73 \pm 3.85 \%$  จากรูปที่ 51 ได้ค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้ง MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง จากการคำนวณเท่ากับ 104.96  $\mu\text{M}$

### 6.1.2 ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดเอ (MAO-A)

จากรูปที่ 51 แสดงผลของ quercetin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ทำการศึกษาโดยเติมซับสเตรตสำหรับ MAO-A คือ 0.1 M 5-HT ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ พบว่า quercetin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้ และฤทธิ์ในการยับยั้งนี้จะเพิ่มขึ้นตามขนาด โดยขนาดต่ำที่สุด 10  $\mu\text{g}$  (15.61  $\mu\text{M}$ ) นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A เพียง  $6.67 \pm 1.67 \%$  เมื่อเพิ่มถึงขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (312.17  $\mu\text{M}$ ) ฤทธิ์ในการยับยั้งก็เพิ่มขึ้นเป็นสามารถยับยั้งได้ถึง  $100.00 \pm 0.00 \%$  ส่วนค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้ง MAO-A จากการคำนวณ มีค่าเป็น 165.11  $\mu\text{M}$

### 6.1.3 ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดบี (MAO-B)

จากรูปที่ 52 แสดงผลของ quercetin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ทำการศึกษาโดยเติมซับสเตรตสำหรับ MAO-B คือ 0.1 M benzylamine HCl ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ พบว่า quercetin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้น้อย โดยที่ขนาดต่ำ 10  $\mu\text{g}$  (15.61  $\mu\text{M}$ ) นั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-B และเมื่อเพิ่มขนาดขึ้นอีกจนถึงขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (312.17  $\mu\text{M}$ ) ฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-B ก็เพิ่มขึ้นเป็นสามารถยับยั้งได้  $58.33 \pm 1.67 \%$  โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้ง MAO-B จากการคำนวณ มีค่าเป็น 197.34  $\mu\text{M}$

จากรูปที่ 53 แสดงผลเปรียบเทียบของ quercetin ขนาดต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO แสดงให้เห็นว่า quercetin มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง แต่มีแนวโน้มว่ามีผลต่อ MAO-A มากกว่า MAO-B

## 6.2 ผลของ naringenin

### 6.2.1 ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง

จากรูปที่ 54 แสดงผลของ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO แบบไม่จำเพาะเจาะจง ทำการศึกษาโดยเติมซับสเตรต คือ 0.1 M tyramine HCl ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรียและ rotenone อยู่ พบว่า naringenin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ในการออกซิไดส์ tyramine ซึ่งเป็นซับสเตรตแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งนี้เพิ่มขึ้นตาม

ขนาดของ naringenin ที่สูงขึ้นด้วย โดยที่ขนาดต่ำสุด 15  $\mu\text{g}$  (26.01  $\mu\text{M}$ ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ MAO ได้  $20.40 \pm 3.53 \%$  และเมื่อเพิ่มขนาดจนถึงขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (364.20  $\mu\text{M}$ ) ฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO ก็เพิ่มขึ้นเป็นสามารถยับยั้งได้  $51.90 \pm 2.38 \%$  และจากรูปที่ 55 คำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้ง MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง มีค่าเป็น 246.32  $\mu\text{M}$

### 6.2.2 ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดเอ (MAO-A)

จากรูปที่ 55 แสดงผลของ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ทำการศึกษาโดยเติมซับสเตรตสำหรับ MAO-A คือ 0.1 M 5-HT ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรีย และ rotenone อยู่ พบว่า naringenin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้ โดยฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A นี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของ naringenin เพิ่มขึ้น กล่าวคือ โดยในขนาดต่ำสุด 15  $\mu\text{g}$  (26.01  $\mu\text{M}$ ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ MAO-A ได้  $41.67 \pm 5.56 \%$  และในขนาดสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 200  $\mu\text{g}$  (364.20  $\mu\text{M}$ ) ฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A ก็เพิ่มขึ้นเป็นสามารถยับยั้งได้  $86.39 \pm 10.01 \%$  ส่วนค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้ง MAO-A จากการคำนวณ มีค่าเท่ากับ 51.26  $\mu\text{M}$

### 6.2.3 ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ชนิดบี (MAO-B)

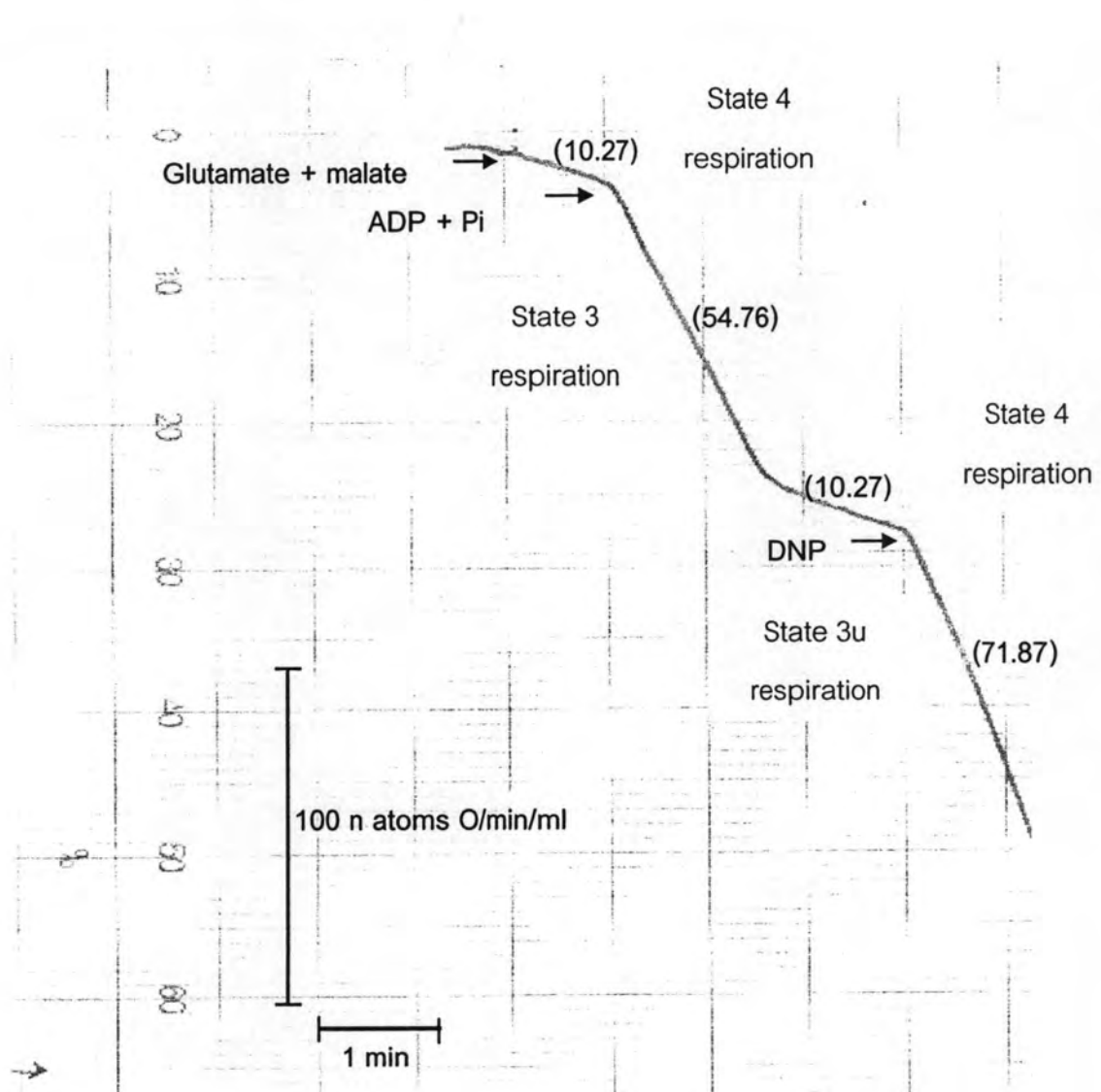
จากรูปที่ 56 แสดงผลของ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ทำการศึกษาโดยเติมซับสเตรตสำหรับ MAO-B คือ 0.1 M benzylamine ลงใน reaction mixture ที่มีไมโตคอนเดรีย และ rotenone อยู่ พบว่า naringenin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้ โดยฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-B นี้เพิ่มขึ้นตามขนาดเช่นเดียวกันกับฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A กล่าวคือ ในขนาดต่ำที่สุด (15  $\mu\text{g}$ ) ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-B และในขนาดสูงสุด (200  $\mu\text{g}$ ) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้เพียง  $59.73 \pm 4.09 \%$  ส่วนค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้ง MAO-B จากการคำนวณ มีค่าเป็น 269.81  $\mu\text{M}$

จากรูปที่ 57 แสดงผลเปรียบเทียบของ naringenin ขนาดต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO แสดงให้เห็นว่า naringenin มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยมีฤทธิ์ยับยั้งต่อ MAO-A มากกว่า MAO-B

รูปที่ 24 แสดง oxygraph tracing ปกติของการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

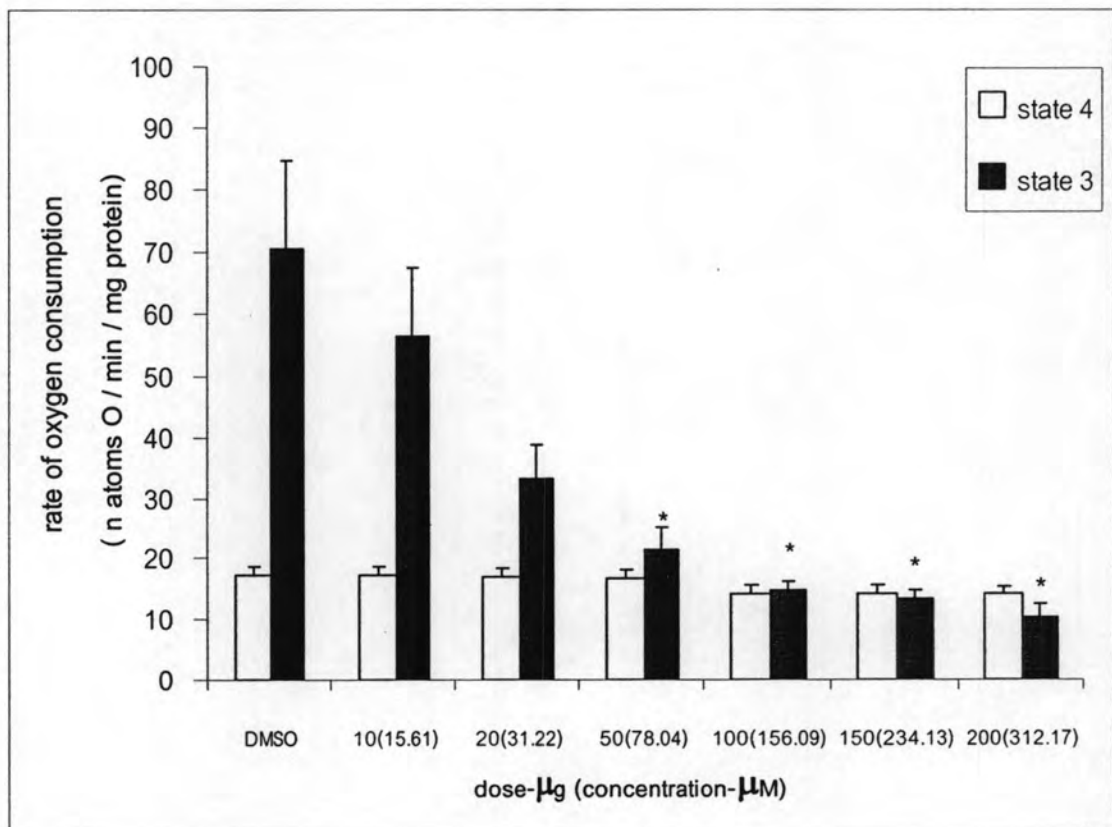
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ คำนวณออกมามีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein



รูปที่ 25 แสดงผลของ quercetin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 4 respiration และ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

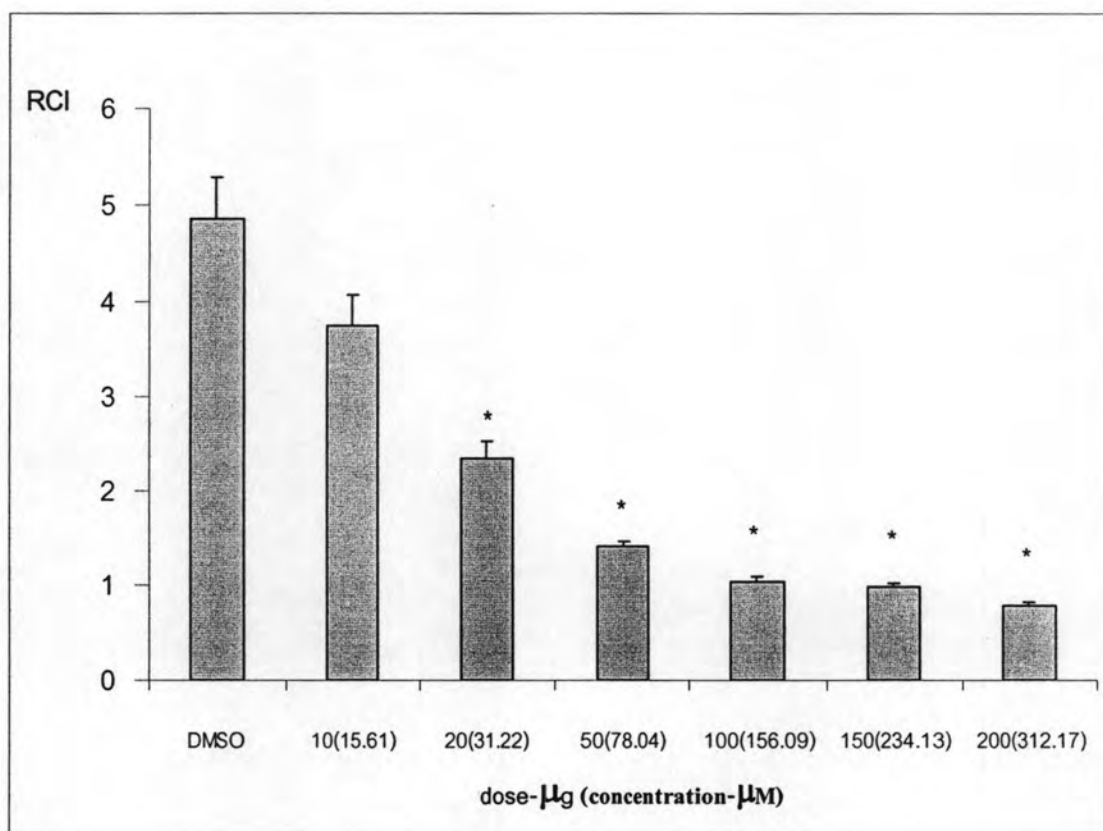


\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 26 แสดงผลของ quercetin ต่อ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโตคอนดริยเจลลี่ 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

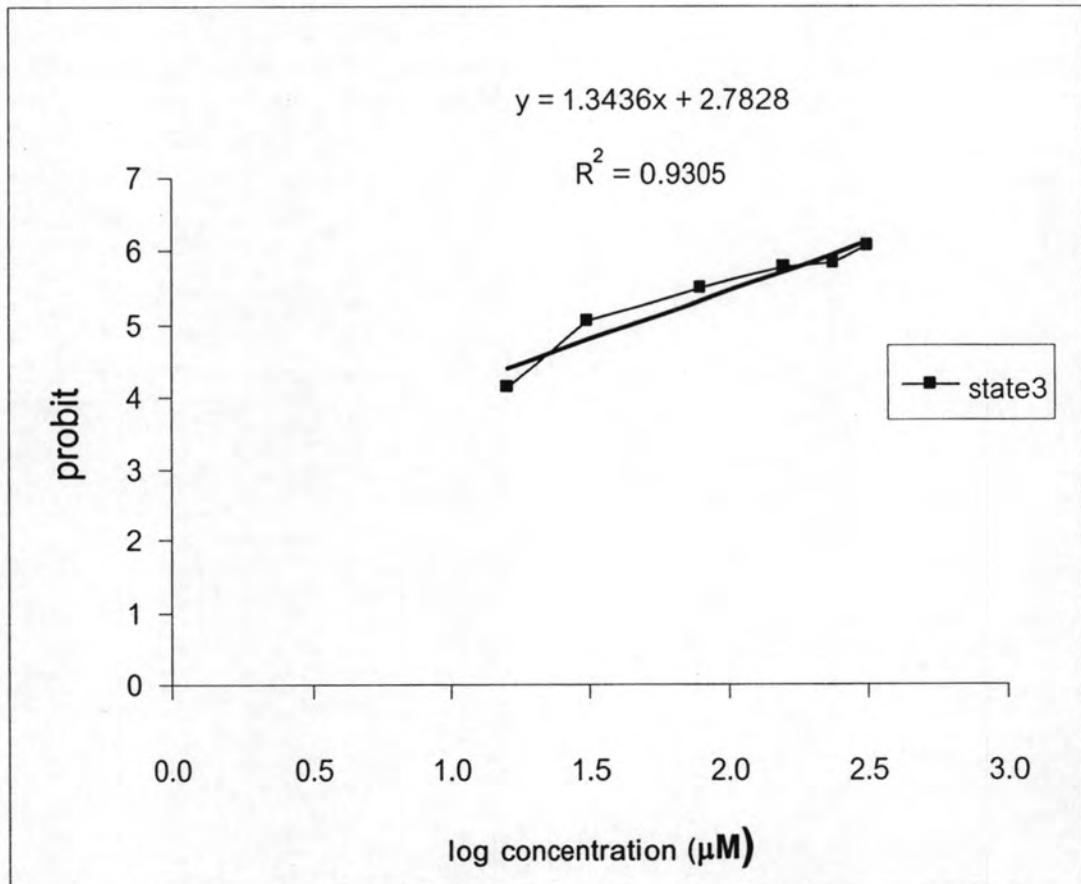


\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 27 แสดง dose-response relationship curve ของ quercetin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

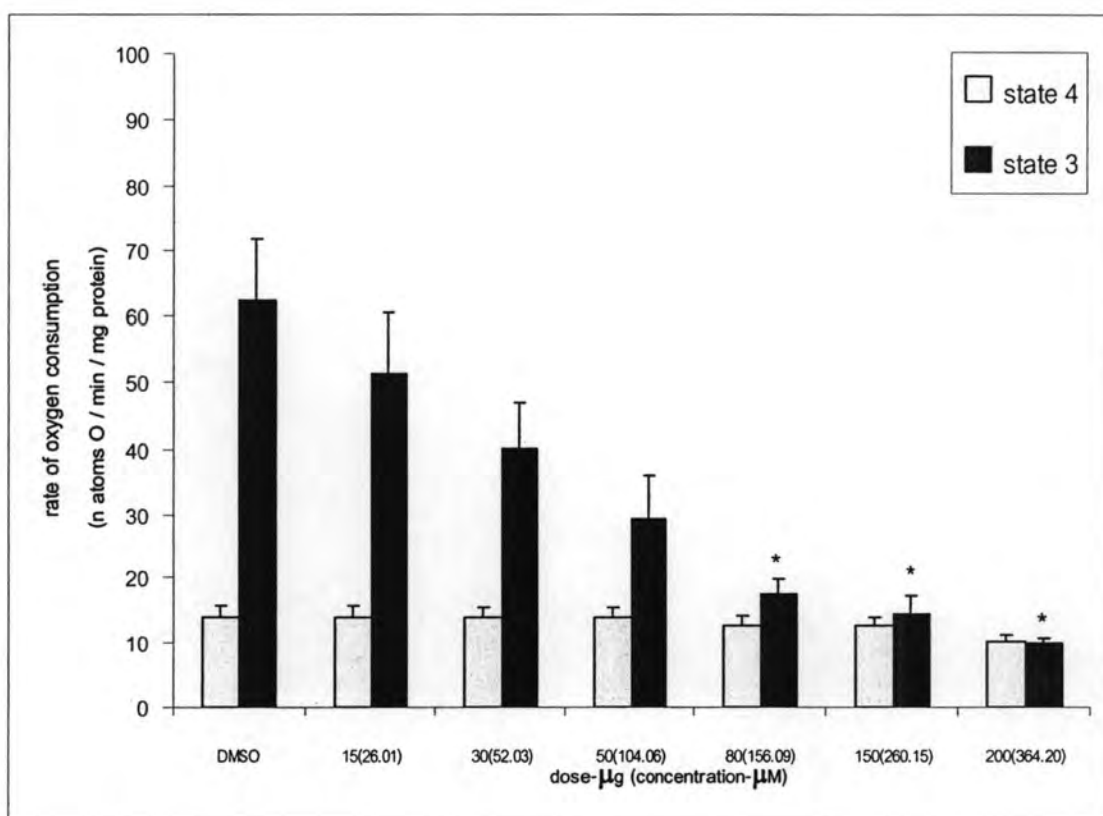
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 28 แสดงผลของ naringenin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในช่วง state 4 respiration และ state 3 respiration เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

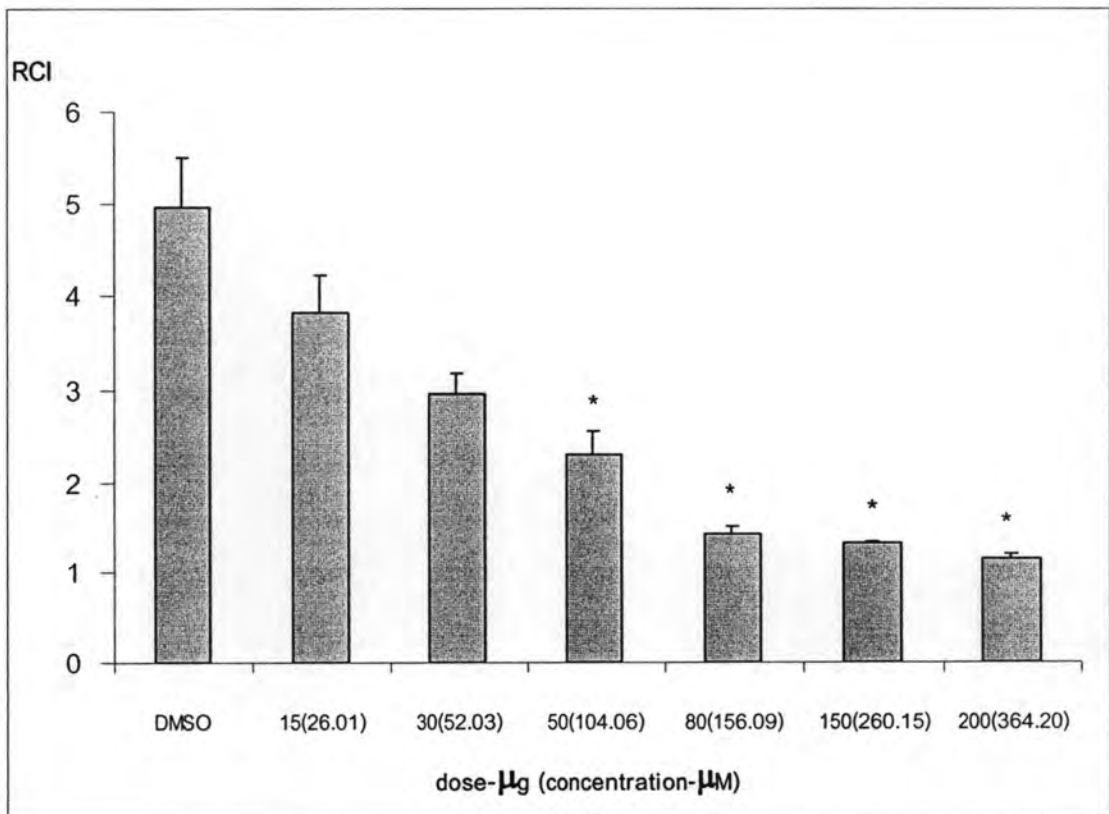


\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 29 แสดงผลของ naringenin ต่อ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโตคอนดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



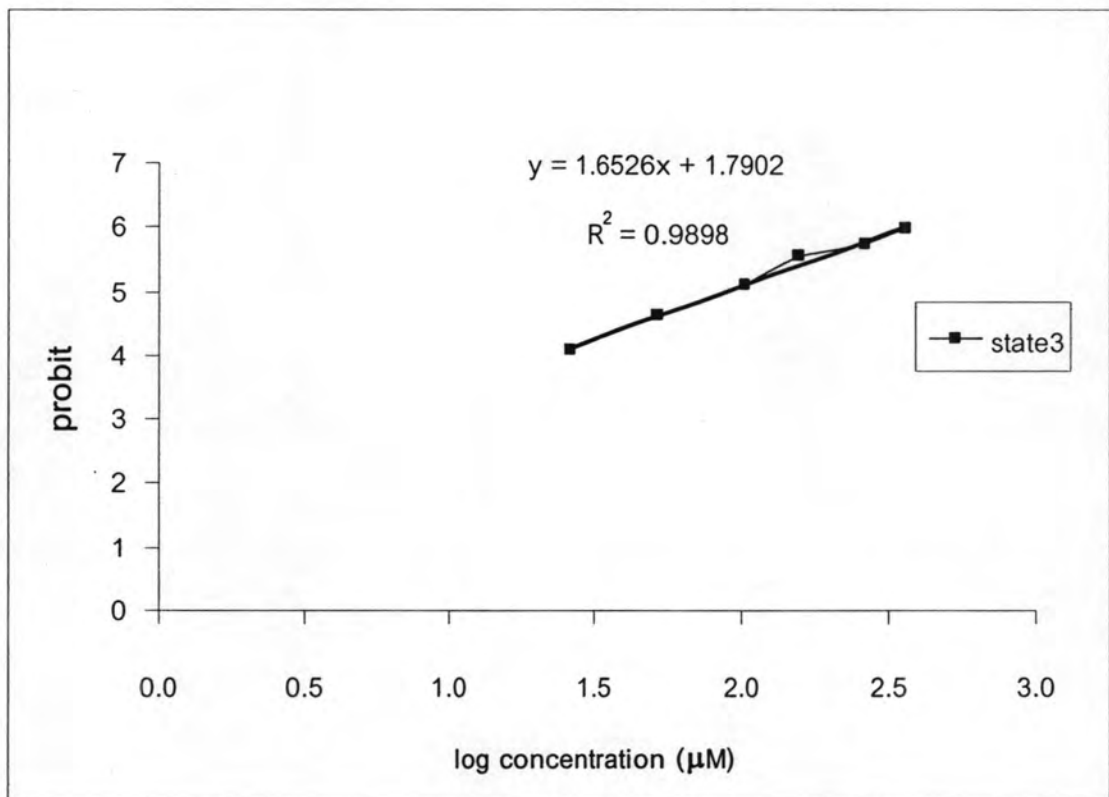
\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



รูปที่ 30 แสดง dose-response relationship curve ของ naringenin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

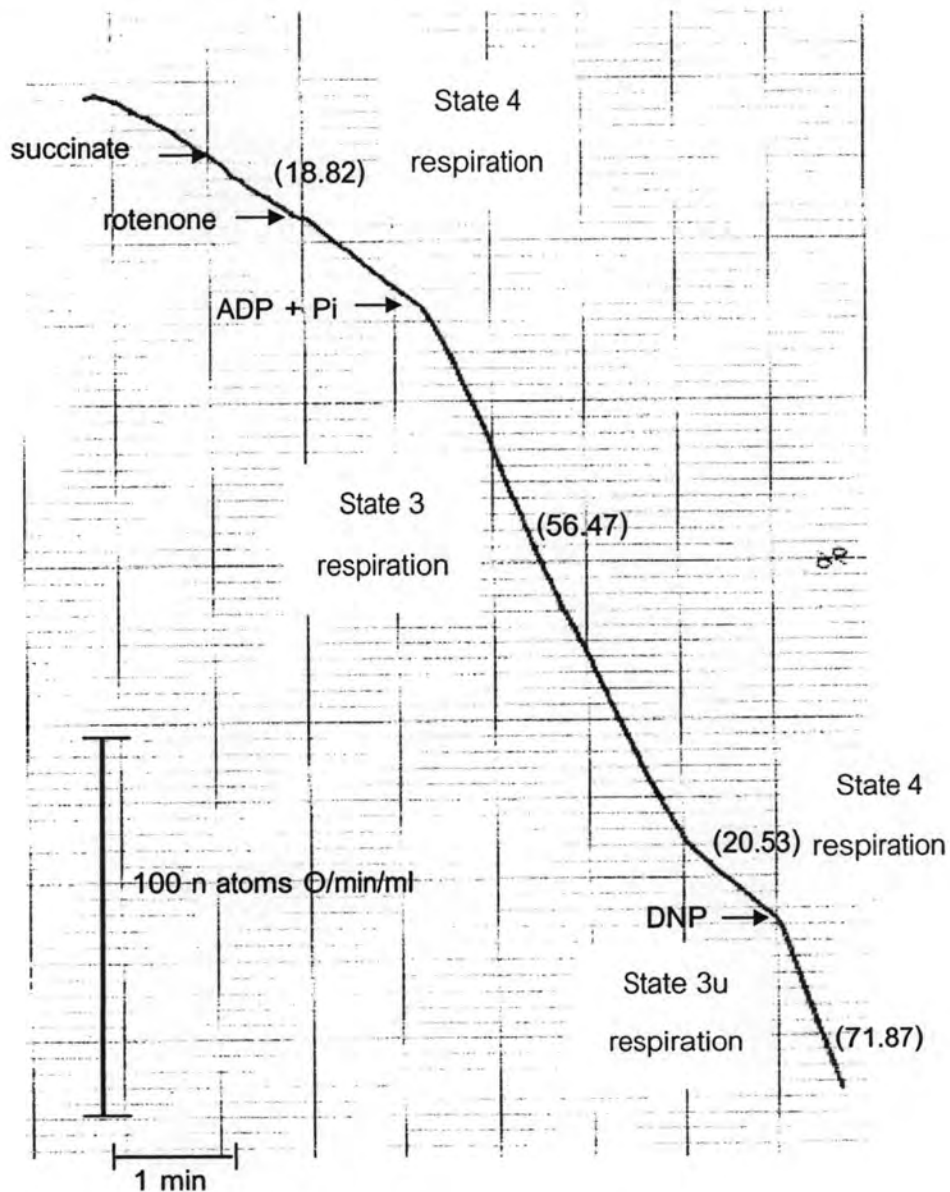
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 31 แสดง oxygraph tracing ปกติของการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

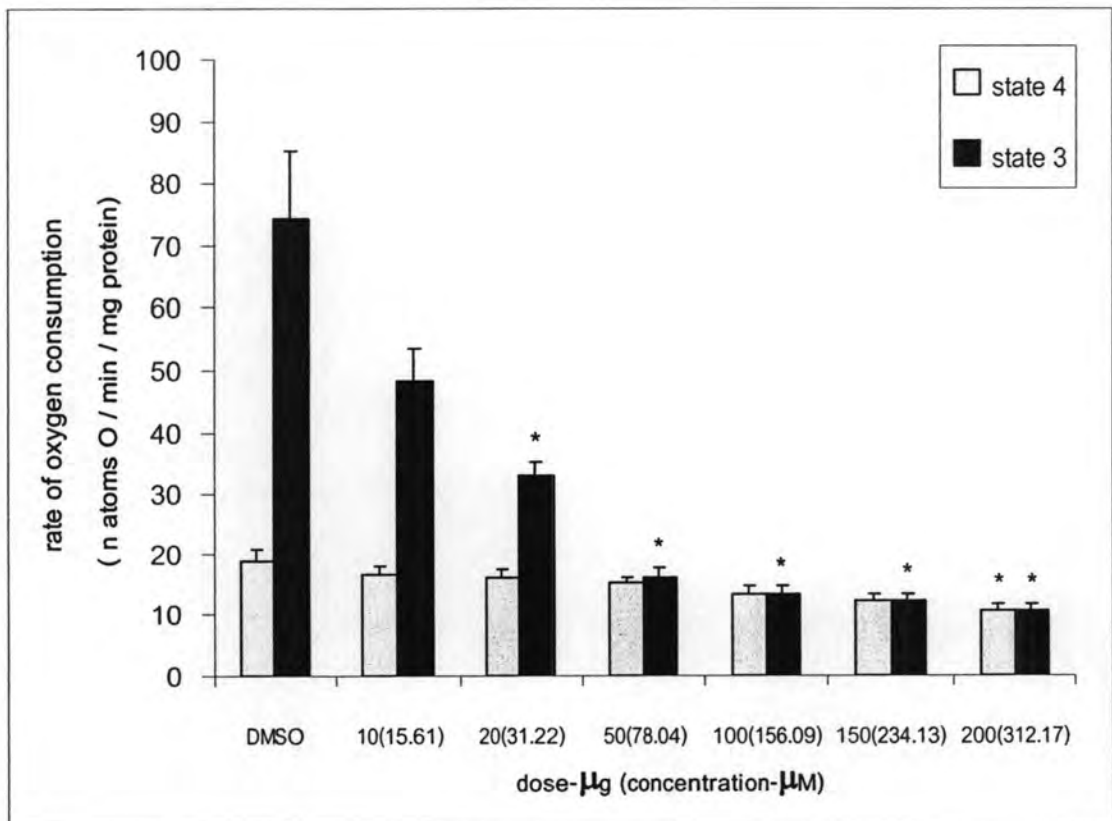
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ แสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ คำนวณออกมาเป็นหน่วยเป็น  $n \text{ atoms O/min/mg protein}$



รูปที่ 32 แสดงผลของ quercetin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในช่วง state 4 respiration และ state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein / ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

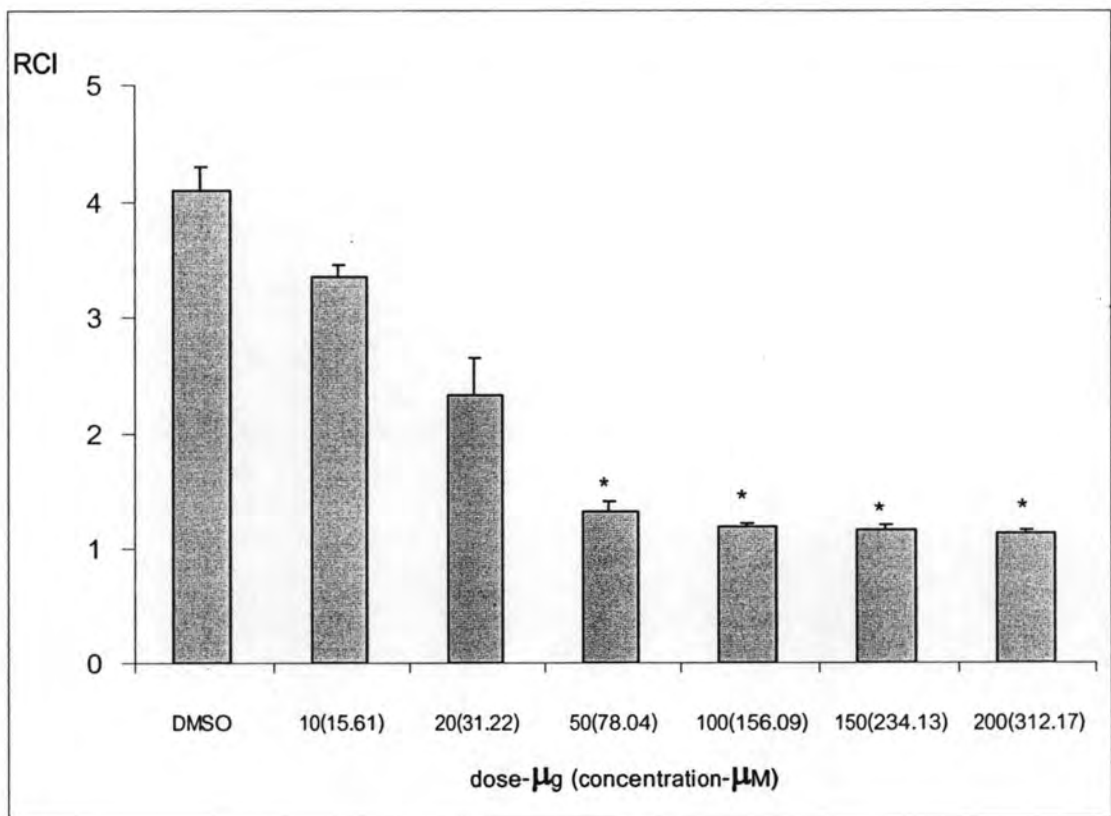


\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 33 แสดงผลของ quercetin ต่อ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10 µl และ ไมโตคอนดริยเจลลี่ 1.83 mg protein / ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

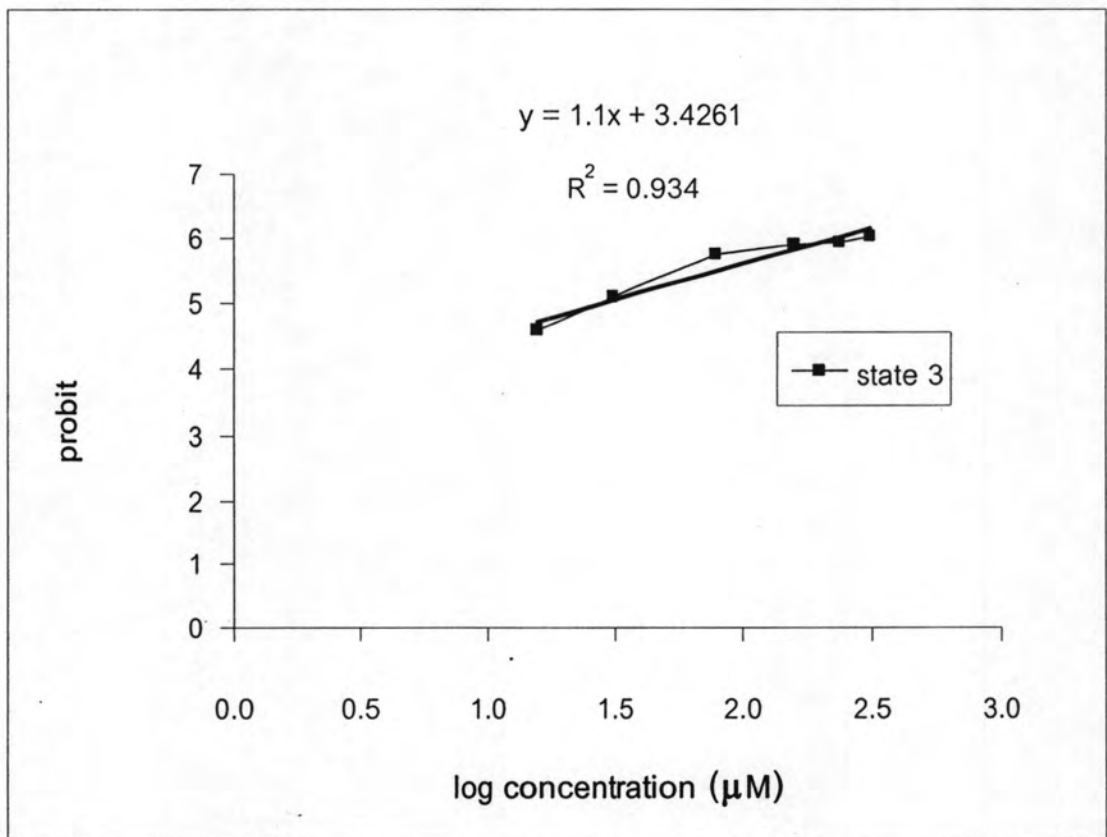


\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 34 แสดง dose-response relationship curve ของ quercetin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein / ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

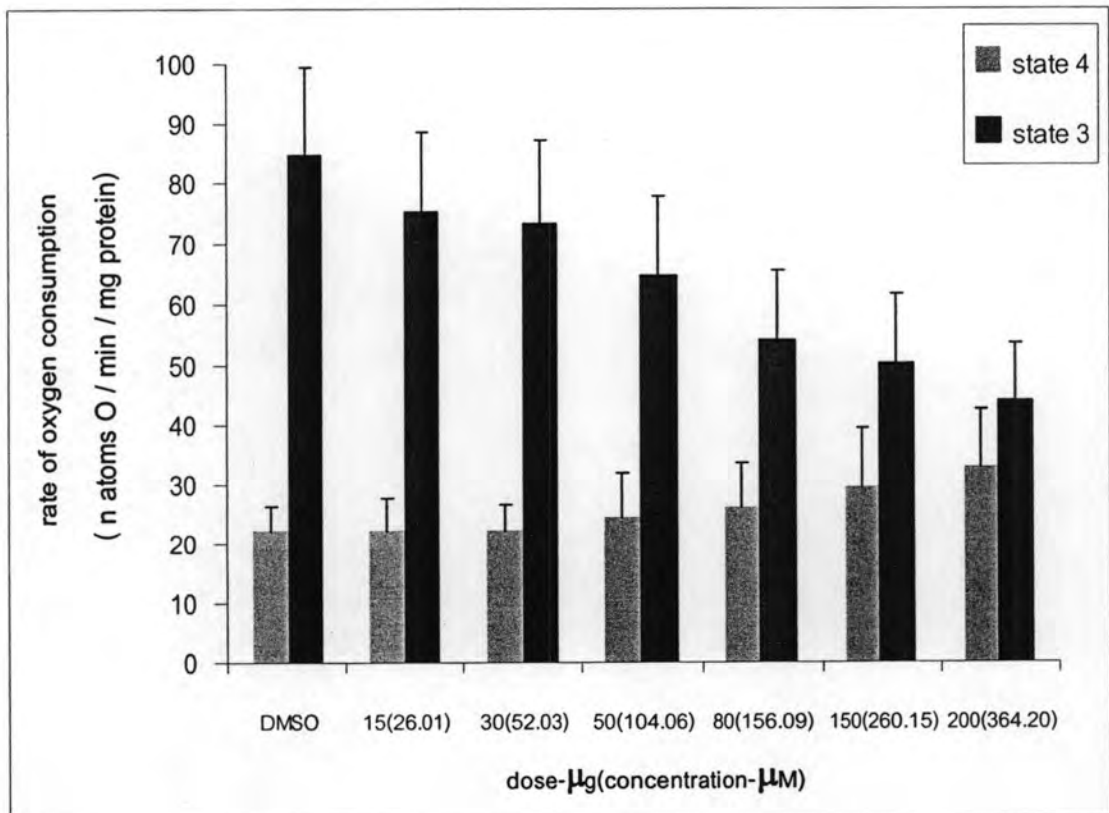
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 35 แสดงผลของ naringenin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในช่วง state 4 respiration และ state 3 respiration เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

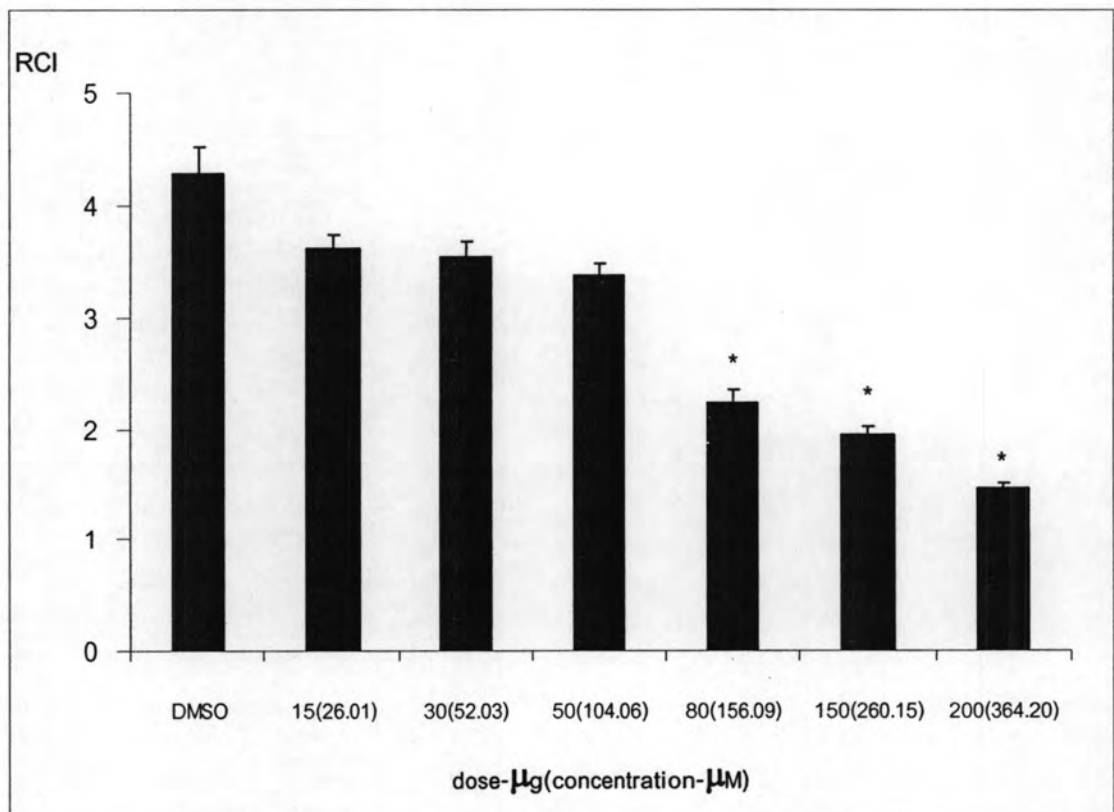


(ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ)

รูปที่ 36 แสดงผลของ naringenin ต่อ respiratory control index (RCI) เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโตคอนดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

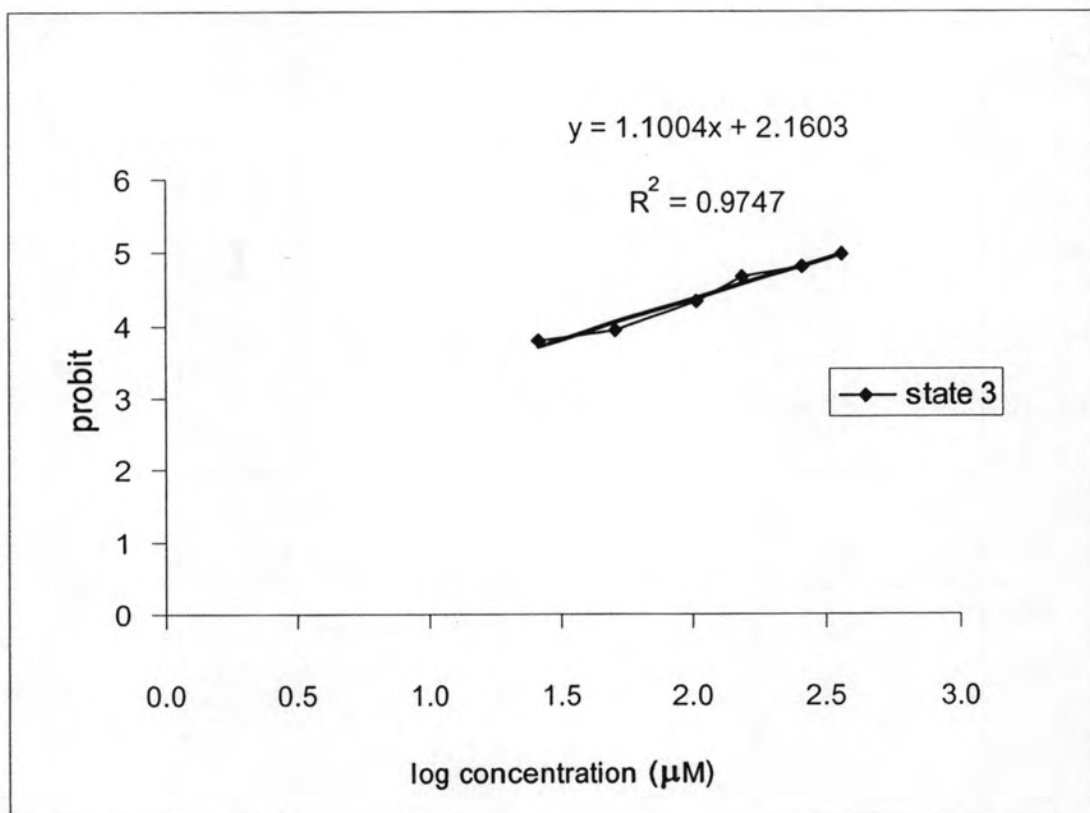


\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 37 แสดง dose-response relationship curve ของ naringenin ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.01 mM rotenone, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.924 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

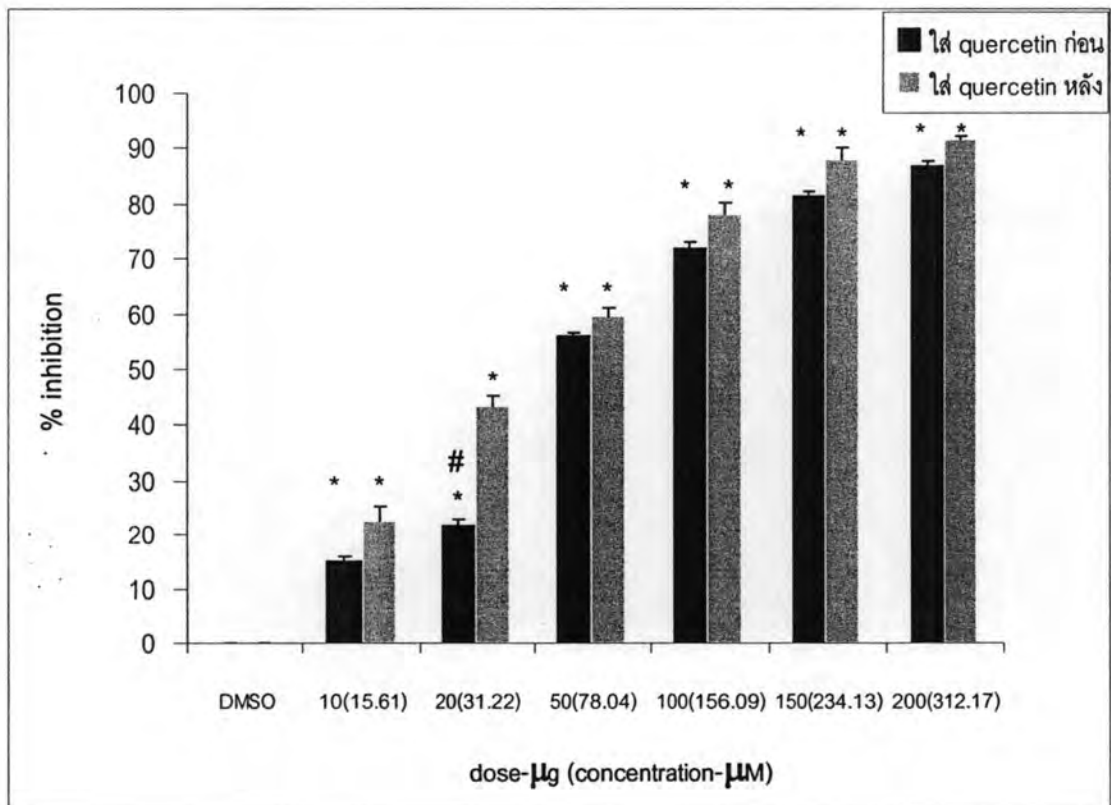




**รูปที่ 38 แสดงผลของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต**

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10 µl และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



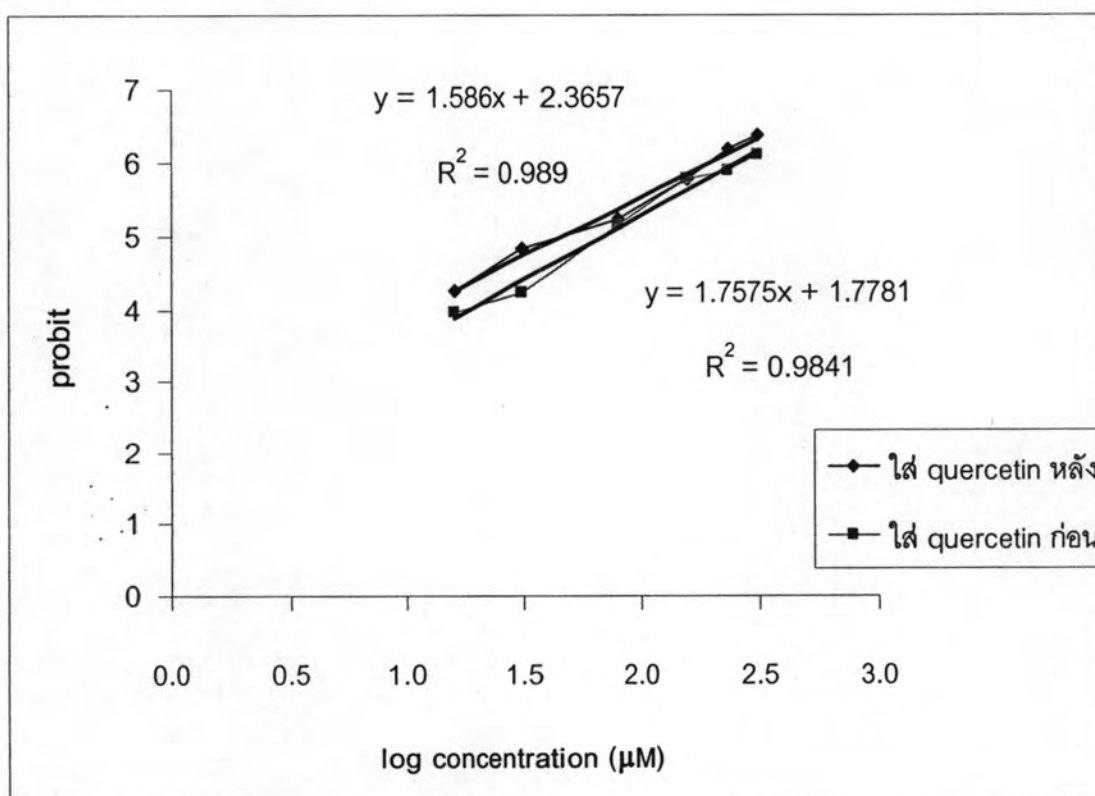
\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

# p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับใส่ quercetin หลัง DNP

รูปที่ 39 แสดง dose-response relationship curve ของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

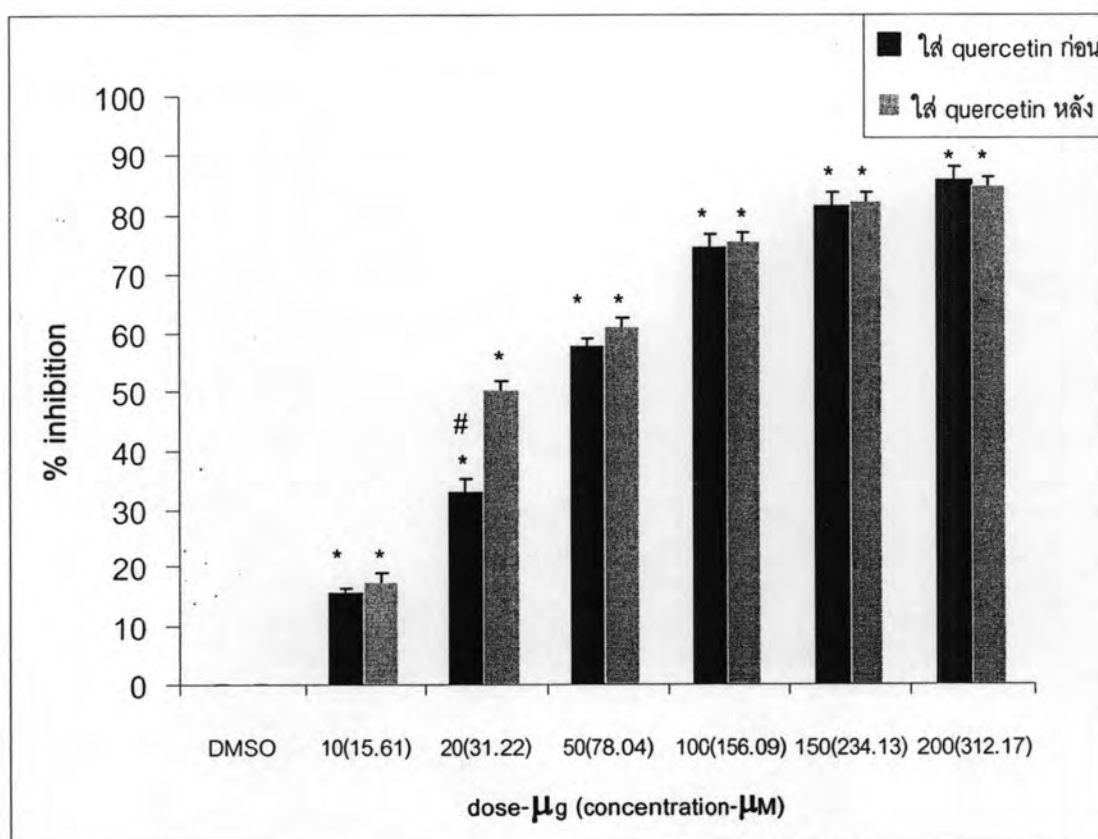
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 40 แสดงผลของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนผสมของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



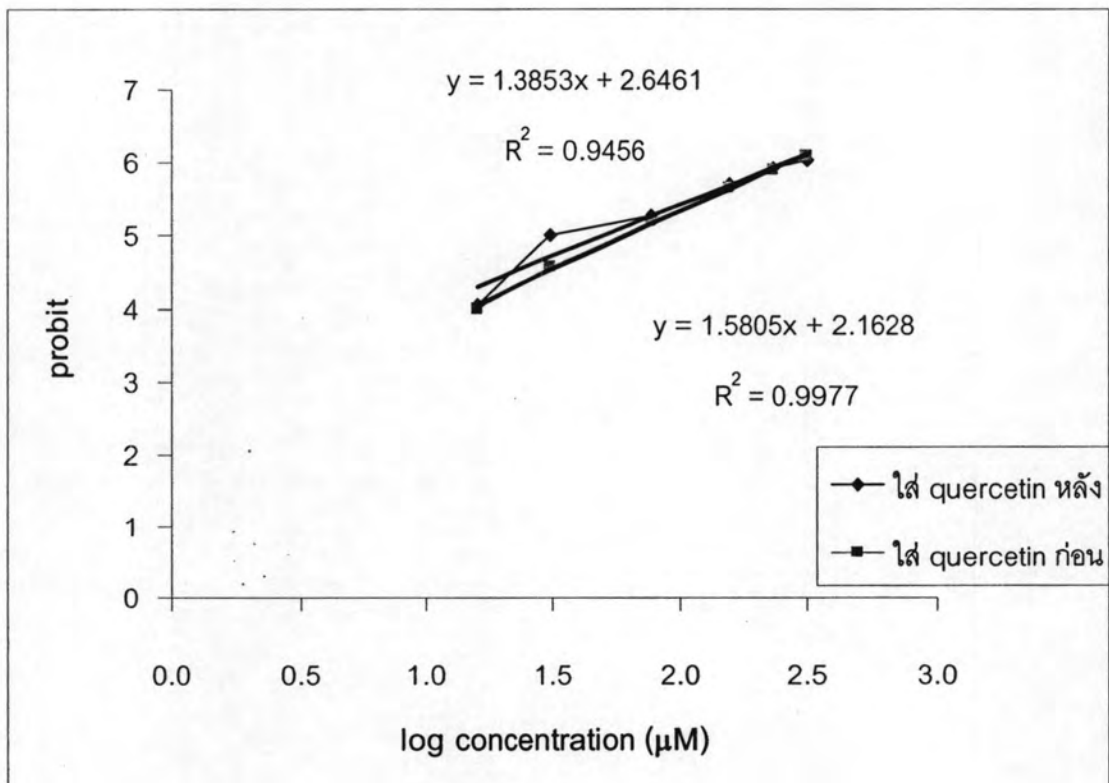
\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

#  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับใส่ quercetin หลัง DNP

รูปที่ 41 แสดง dose-response relationship curve ของ quercetin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

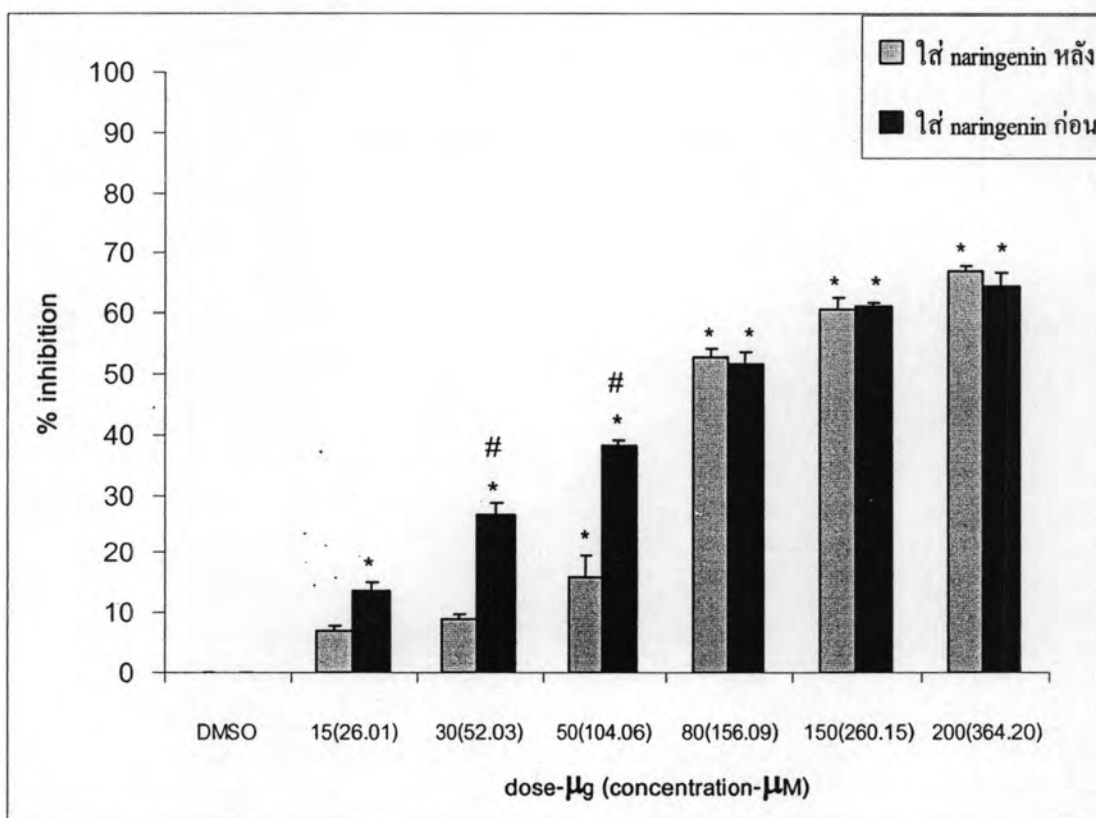
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 42 แสดงผลของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM MgCl<sub>2</sub>, 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



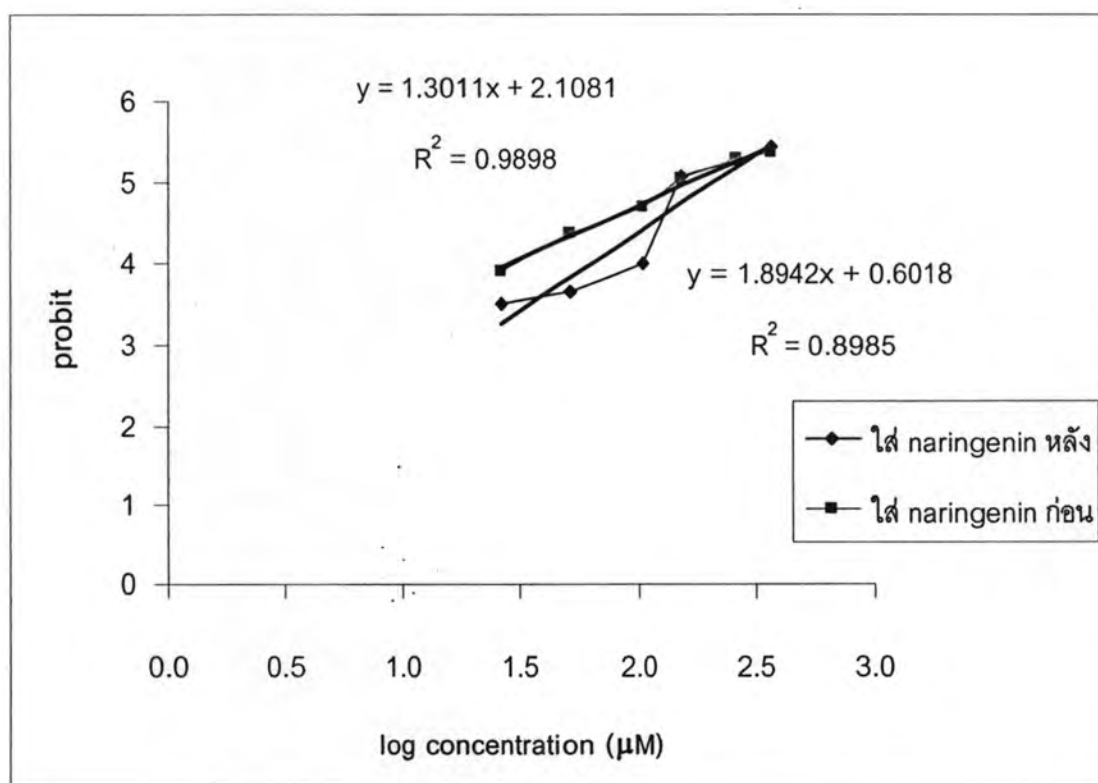
\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

#  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับใส่ naringenin หลัง

รูปที่ 43 แสดงผลของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM glutamate + 5.20 mM malate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

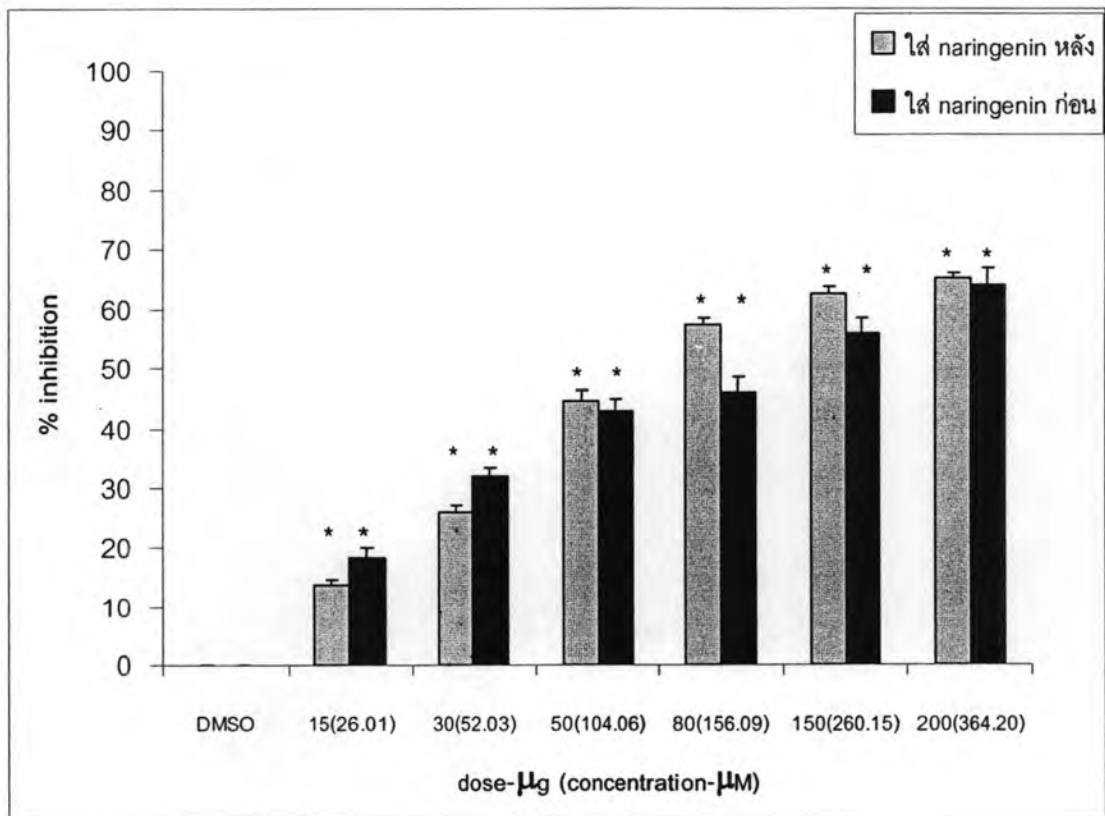
แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 44 แสดงผลของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

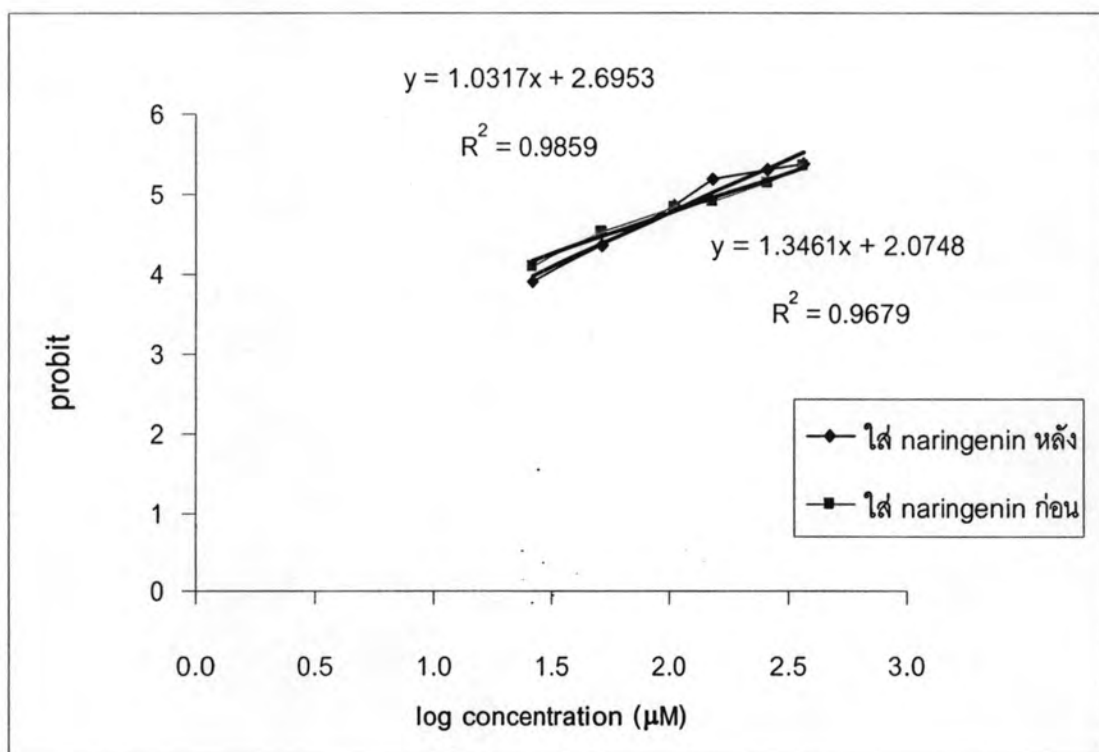


\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

รูปที่ 45 แสดง dose-response relationship curve ของ naringenin ต่อการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย DNP เมื่อใช้ succinate เป็นซับสเตรต

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 38.09 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.90 mM  $MgCl_2$ , 87.60 mM KCl, 5.20 mM succinate, 0.31 mM ADP + 0.62 mM Pi, 0.05 mM DNP, 13.02 mM sucrose ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

แต่ละจุดที่แสดงแทนค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)

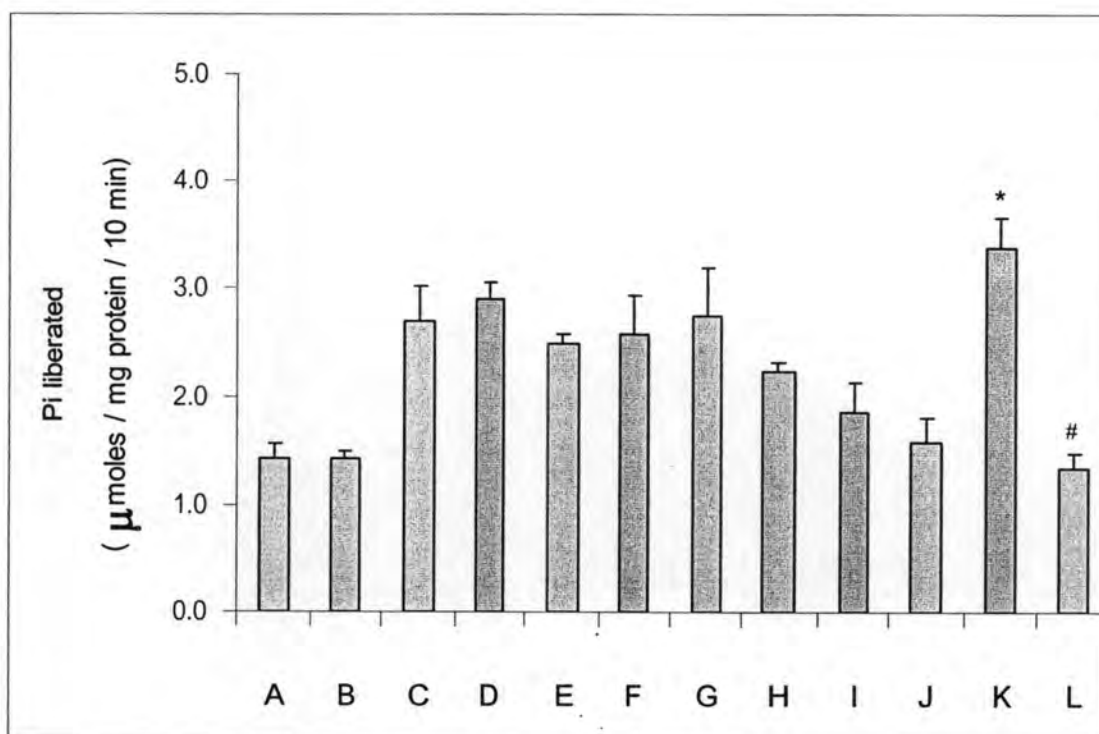




### รูปที่ 46 แสดงผลของ quercetin ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM  $MgCl_2$ , 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโทคอนดริยเจลลี่ 2.99 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

# p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.17mM DNP

A = non DMSO

B = DMSO

C = quercetin 10  $\mu$ g (10.03  $\mu$ M)

D = quercetin 20  $\mu$ g (20.07  $\mu$ M)

E = quercetin 50  $\mu$ g (50.17  $\mu$ M)

F = quercetin 100  $\mu$ g (100.33  $\mu$ M)

G = quercetin 150  $\mu$ g (150.50  $\mu$ M)

H = quercetin 200  $\mu$ g (200.67  $\mu$ M)

I = quercetin 50  $\mu$ g (50.17  $\mu$ M) + 5 mg/ml oligomycin 2  $\mu$ l

J = quercetin 100  $\mu$ g (100.33  $\mu$ M) + 5 mg/ml oligomycin 2  $\mu$ l

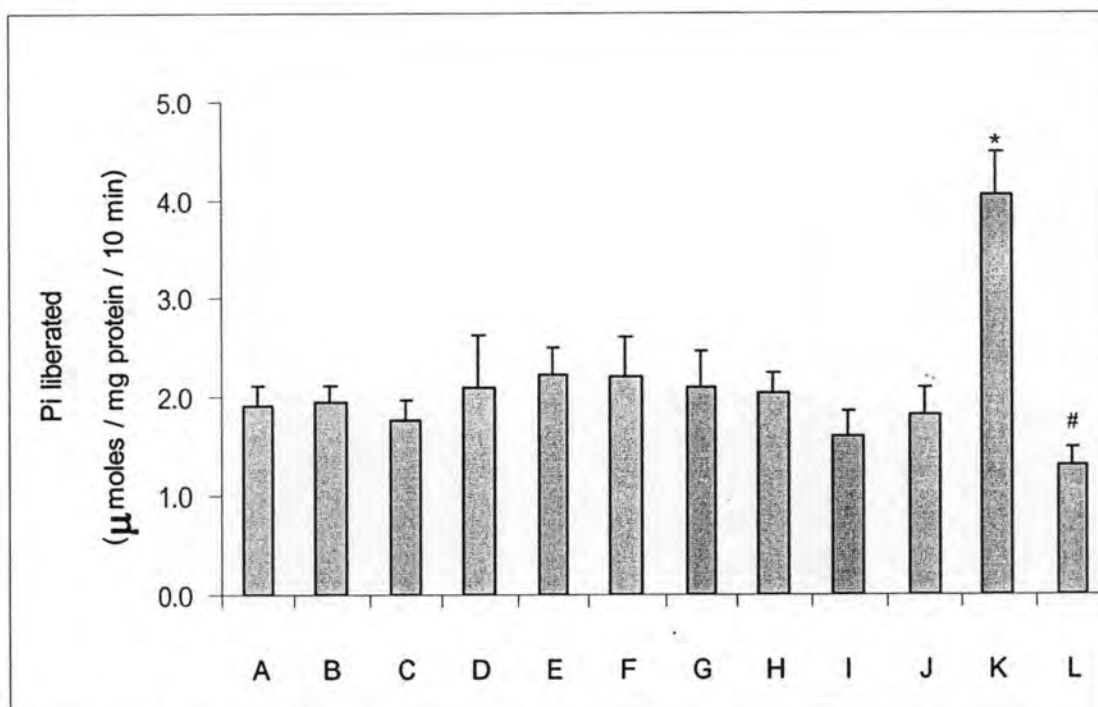
K = 0.17 mM DNP

L = 0.17 mM DNP + 5 mg/ml oligomycin 2  $\mu$ l

### รูปที่ 47 แสดงผลของ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 35.18 mM HEPES buffer pH 7.2, 1.76 mM  $MgCl_2$ , 80.92 mM KCl, 16.72 mM sucrose ส่วนประกอบที่เติมตามลงไปคือ 5.02 mM ATP, 0.17 mM DNP ในการทดลองควบคุมเติม DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และไมโทคอนดรียเฉลี่ย 2.99 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 2.99 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO

#  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.17mM DNP

A = non DMSO

B = DMSO

C = naringenin 15  $\mu$ g (16.72  $\mu$ M)

D = naringenin 30  $\mu$ g (33.44  $\mu$ M)

E = naringenin 50  $\mu$ g (66.89  $\mu$ M)

F = naringenin 80  $\mu$ g (100.33  $\mu$ M)

G = naringenin 150  $\mu$ g (167.22  $\mu$ M)

H = naringenin 200  $\mu$ g (234.11  $\mu$ M)

I = naringenin 30  $\mu$ g (33.44  $\mu$ M) + 5 mg/ml oligomycin 2  $\mu$ l

J = naringenin 80  $\mu$ g (100.33  $\mu$ M) + 5 mg/ml oligomycin 2  $\mu$ l

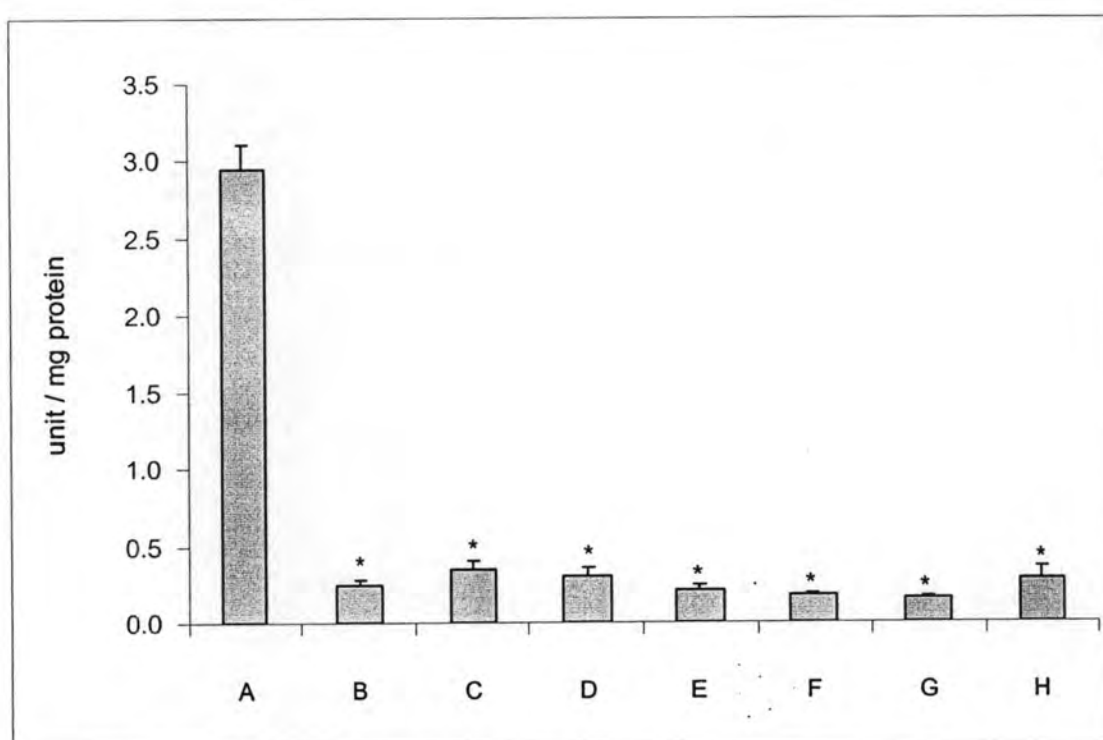
K = 0.17 mM DNP

L = 0.17 mM DNP + 5 mg/ml oligomycin 2  $\mu$ l

### รูปที่ 48 แสดงผลของ quercetin ต่อการเกิด lipid peroxidation

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.2 mg ascorbate, 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>, 20% TCA ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10 µl และ ไมโตคอนดรียเฉลี่ย 0.74 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 3.13 ml อุณหภูมิ 38°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



\* p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

A = DMSO + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

B = quercetin 10 µg (9.58 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

C = quercetin 20 µg (19.17 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

D = quercetin 50 µg (47.92 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

E = quercetin 100 µg (95.85 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

F = quercetin 150 µg (143.77 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

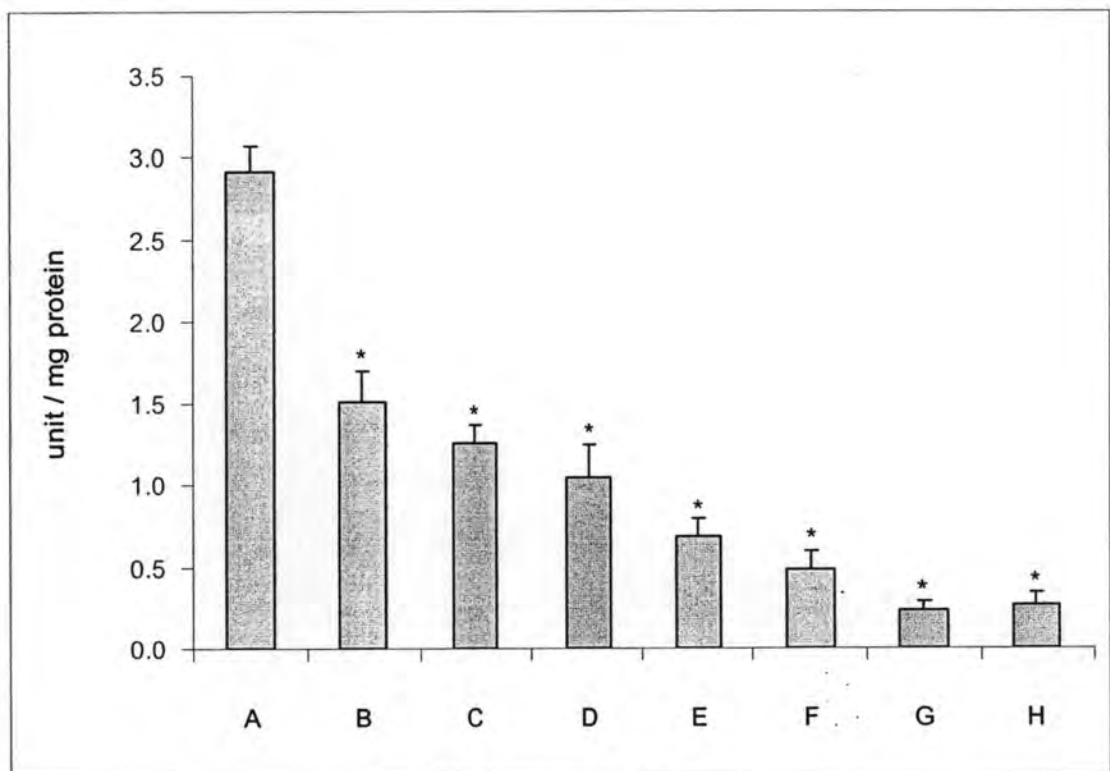
G = quercetin 200 µg (191.69 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

H = 1.2 mM EDTA + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

### รูปที่ 49 แสดงผลของ naringenin ต่อการเกิด lipid peroxidation

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.2 mg ascorbate, 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>, 20% TCA ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10 µl ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10 µl และ ไมโตคอนดรียเฉลี่ย 0.74 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 3.13 ml อุณหภูมิ 38°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

A = DMSO + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

B = naringenin 15 µg (15.97 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

C = naringenin 30 µg (31.95 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

D = naringenin 50 µg (63.90 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

E = naringenin 80 µg (95.85 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

F = naringenin 150 µg (159.74 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

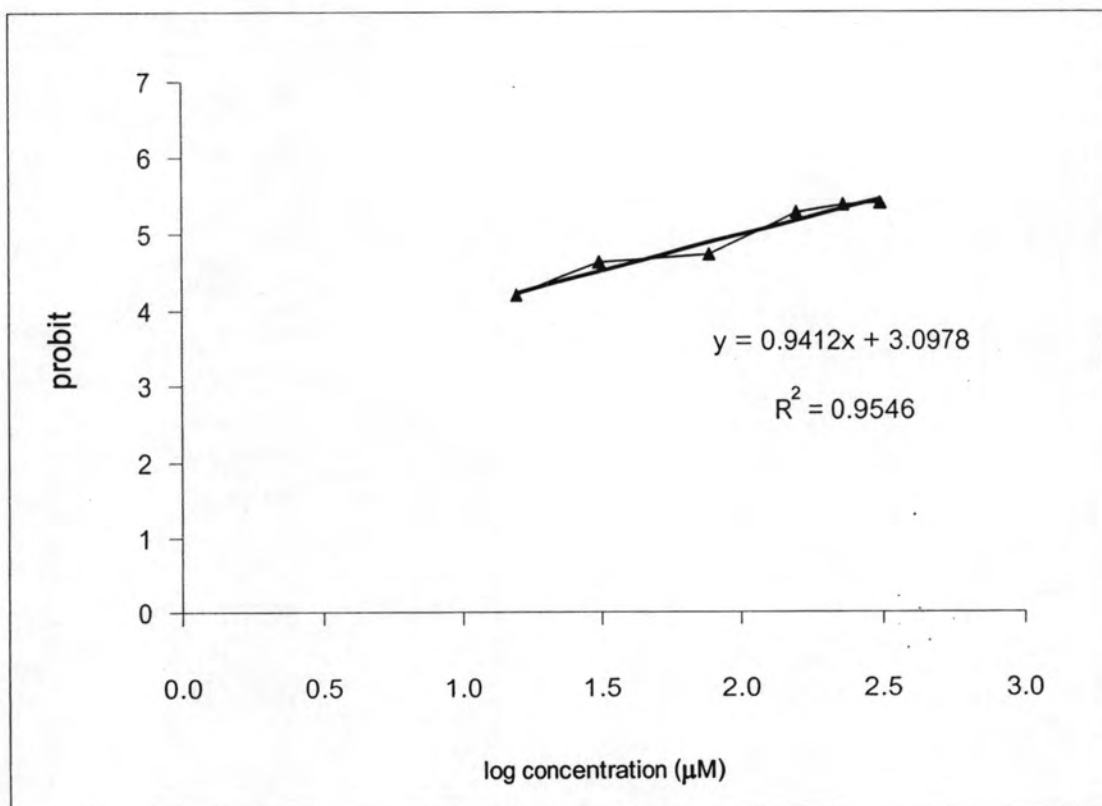
G = naringenin 200 µg (223.64 µM) + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

H = 1.2 mM EDTA + ascorbate + FeSO<sub>4</sub>

รูปที่ 50 แสดง dose-response relationship curve ของ quercetin ต่อการทำงานของ เอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M tyramine 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วน การทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโตคอนดริยเจลลี่ 1.83 mg protein / ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

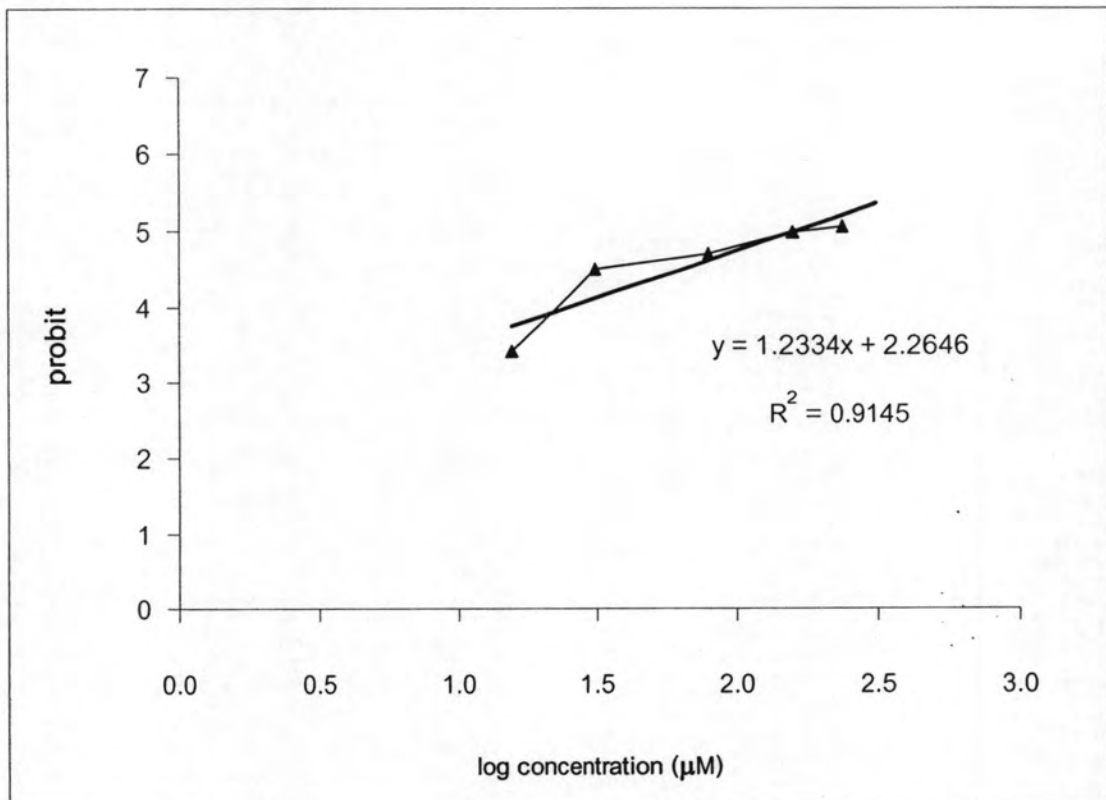
ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 51 แสดง dose-response relationship curve ของ quercetin ต่อการทำงานของ เอนไซม์ MAO-A

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M 5-HT 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และไมโทคอนดริยเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

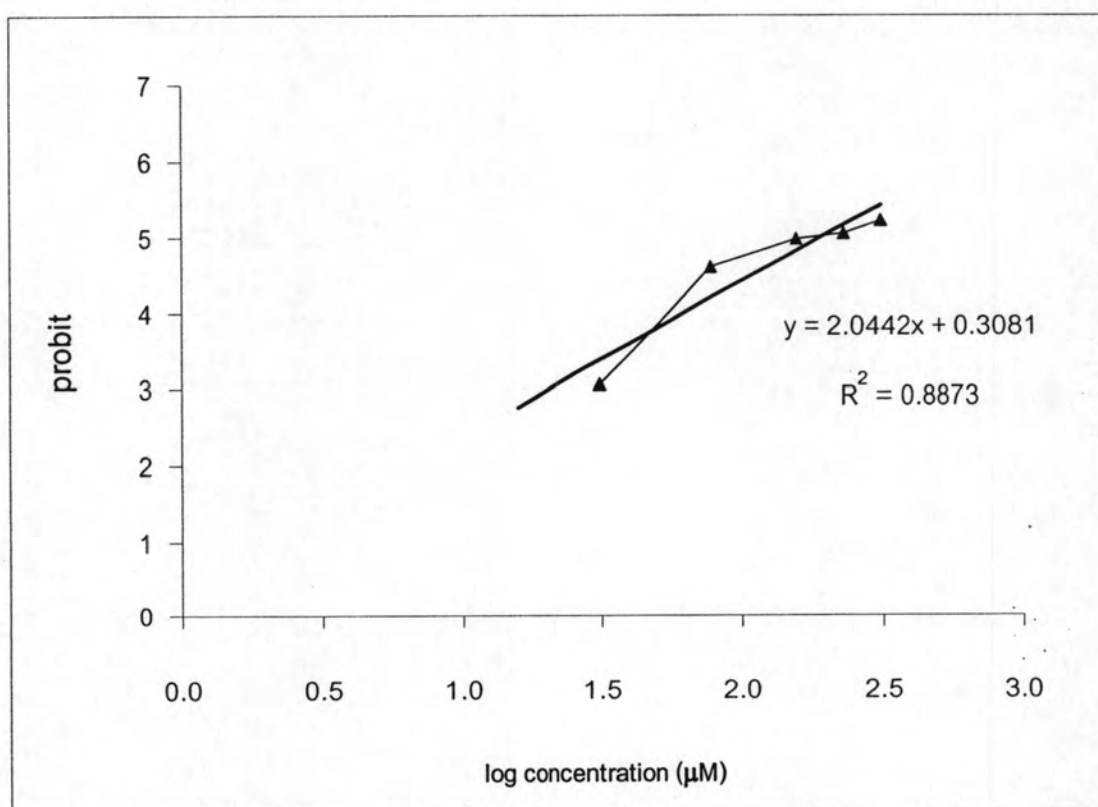
ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



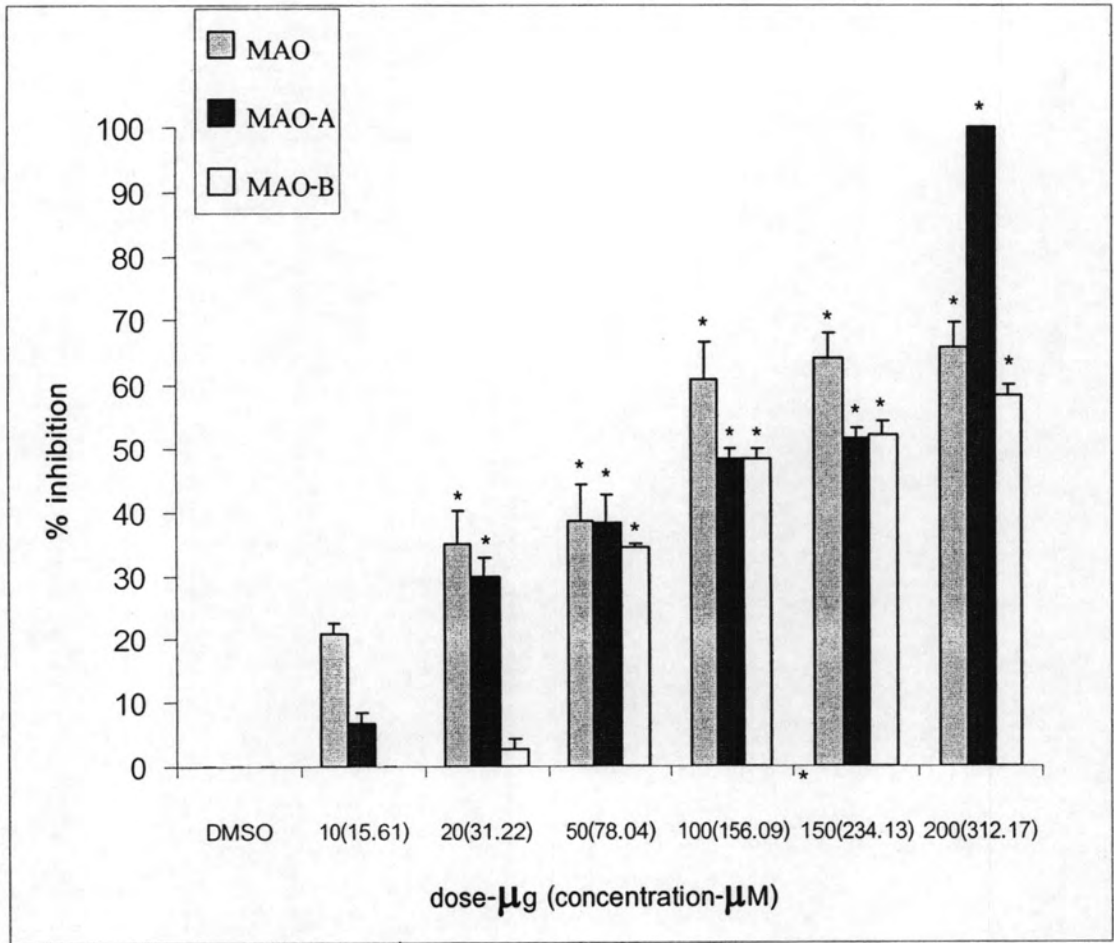
รูปที่ 52 แสดง dose-response relationship curve ของ quercetin ต่อการทำงานของ เอนไซม์ MAO-B

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M benzylamine 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l การทดลองเพื่อศึกษาเติม quercetin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 53 แสดงการเปรียบเทียบผลของ quercetin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO



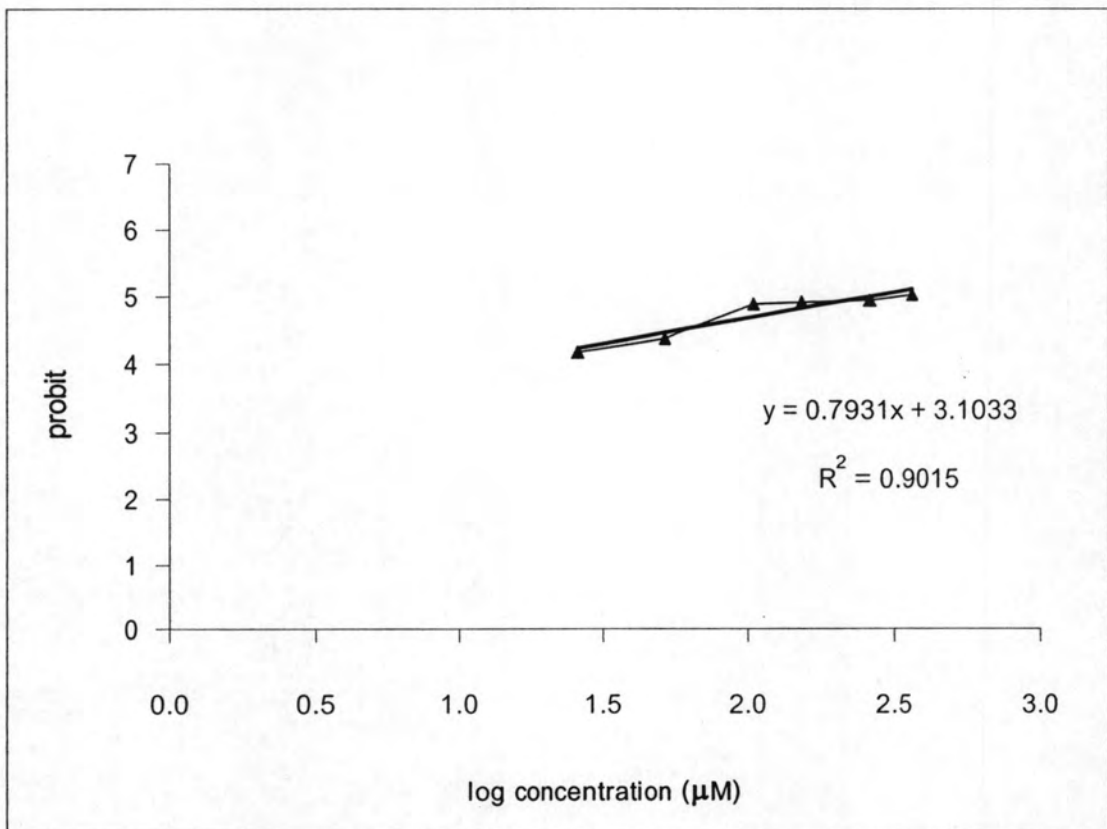
\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO



**รูปที่ 54** แสดง dose-response relationship curve ของ naringenin ต่อการทำงานของ เอนไซม์ MAO ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M tyramine 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วน การทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และไมโตคอนดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

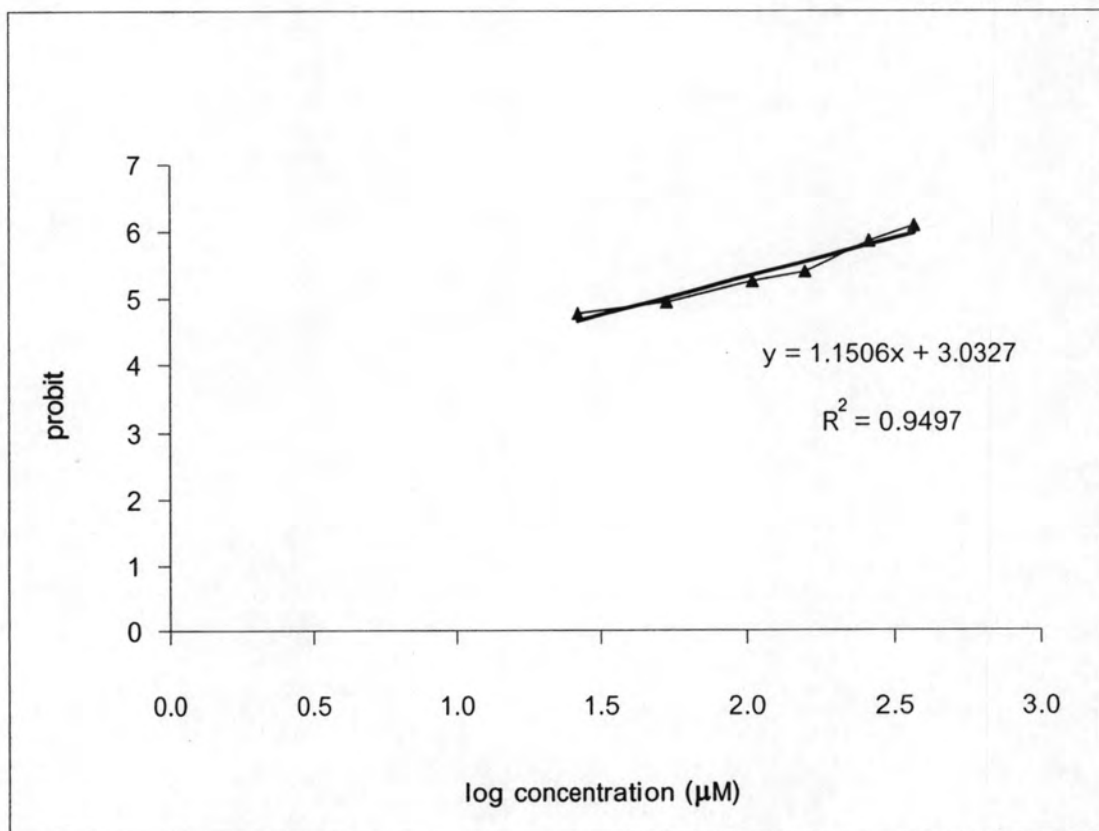
ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การ ทดลอง (n = 4)



รูปที่ 55 แสดง dose-response relationship curve ของ naringenin ต่อการทำงานของ เอนไซม์ MAO-A

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M 5-HT 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเต็ม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และไมโตคอนดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

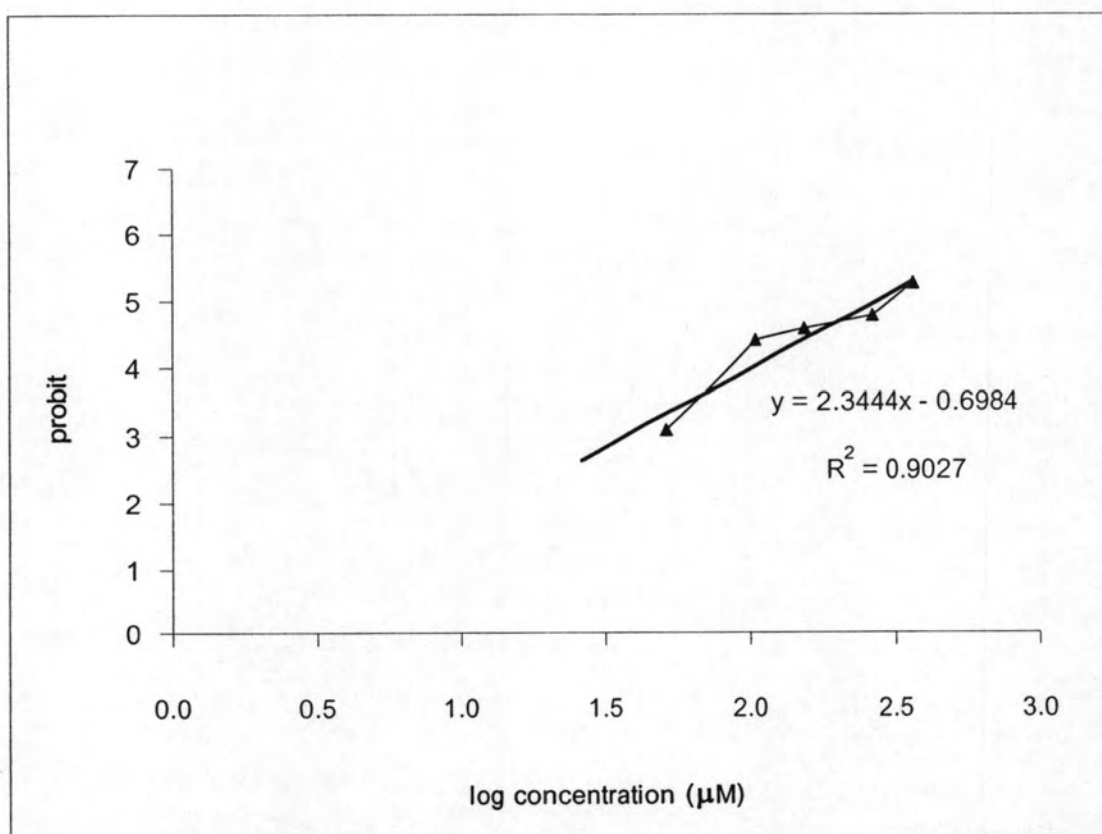
ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



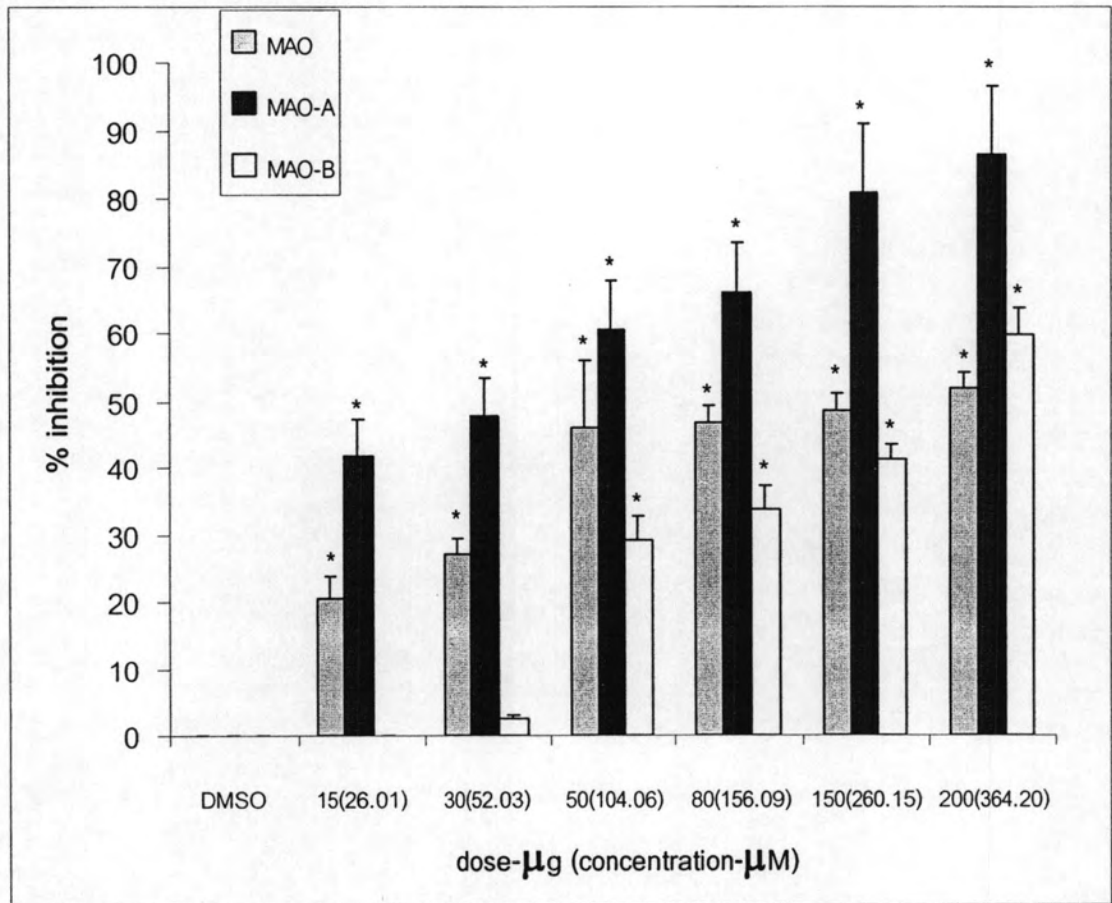
รูปที่ 56 แสดง dose-response relationship curve ของ naringenin ต่อการทำงานของ เอนไซม์ MAO-B

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : 0.05 M phosphate buffer pH 7.2, 0.01 mM rotenone, 13.02 mM sucrose, 0.1 M benzylamine 10  $\mu$ l ในการทดลองควบคุมใช้ DMSO ปริมาณ 10  $\mu$ l ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาเติม naringenin ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 10  $\mu$ l และ ไมโตคอนดรียเฉลี่ย 1.83 mg protein/ml ปริมาตรทั้งหมด 1.922 ml อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (n = 4)



รูปที่ 57 แสดงการเปรียบเทียบผลของ naringenin ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO



\*  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO