

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 ผลของ CU 763-10-01, CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

3.1.1 ผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะปกติ

จากรูปที่ 17, 18 และ 19 tracing (A) แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะปกติ เมื่อเริ่ม incubate ไมโตคอนเดรียกับสับสเตรท (glutamate + malate) ในปริมาณมากเพียงพอที่จำเป็นต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ปริมาณออกซิเจนใน reaction medium จะลดลงอย่างช้าๆ มีอัตราการใช้ออกซิเจนต่ำ (38.92 natoms O / ml / min) ในระยะนี้ไมโตคอนเดรียจะใช้ออกซิเจนในการรับอิเล็กตรอนบนลูกโซ่หายใจ (respiratory chain) เพียงอย่างเดียว ยังไม่มีการสร้าง ATP เรียกระยะนี้ว่า state 4 respiration เมื่อมีการเติม ADP + Pi ลงไป อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (233.57 natoms O / ml / min) เนื่องจากไมโตคอนเดรียเปลี่ยนแปลงพลังงานจากการรับส่งอิเล็กตรอนไปใช้ในการสร้าง ATP เรียกการหายใจของ ไมโตคอนเดรียในระยะนี้ว่า state 3 respiration เมื่อ ADP + Pi ถูกใช้หมดไปในการทำสังเคราะห์ ATP อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะลดลง (55.61 natoms O / ml / min) กลับสู่ state 4 respiration อีกครั้งหนึ่ง และเมื่อเติม DNP ซึ่งมีคุณสมบัติ uncoupler ลงไป จะทำให้ไมโตคอนเดรียมีการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วโดยไม่มีการสร้าง ATP เนื่องจากเกิด uncoupling อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจะเพิ่มขึ้น (333.67 natoms O / ml / min) และจะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไปจนกระทั่งออกซิเจนหมดไปจาก reaction chamber เรียกการหายใจของไมโตคอนเดรียในระยะนี้ว่า state 3u respiration

3.1.2 ผลของ CU 763-10-01 ขนาดต่าง ๆ ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 17 tracings (B) และ (C) แสดงให้เห็นว่า CU 763-10-01 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ 3u respiration ได้ (ในการแสดงผลการทดลองจะใช้ชื่อโดยย่อว่า CU-10-01, CU-14-07 และ CU-14-10 แทน) กล่าวคือ เมื่อเติมสารในขนาด 20 μ M และ 60 μ M ลงไป จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า CU 763-10-01 จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะปกติเป็น 77.85, 50.05 natoms O / ml / min ตามลำดับ และเมื่อเติม DNP พบว่าอัตรา

การใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะปกติเช่นกันเป็น 88.98, 50.05 natoms O / ml / min ตามลำดับ

3.1.3 ผลของ CU 763-14-07 ขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 18 tracings (B) และ (C) แสดงให้เห็นว่า CU 763-14-07 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ 3u respiration ได้ กล่าวคือเมื่อเติมสารลงใน reaction medium ให้มีความเข้มข้น 20 μ M และ 60 μ M จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า CU 763-14-07 จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น 194.64, 122.34 natoms O / ml / min ตามลำดับ และเมื่อเติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงเป็น 244.69, 136.25 natoms O / ml / min ตามลำดับ

3.1.4 ผลของ CU 763-14-10 ขนาดต่างๆต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

รูปที่ 19 tracing (B) แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ CU 763-14-10 ในการทดลองนี้ ไม่มีผลต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย

CU 763-14-10 สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 และ 3u respiration ได้ รูปที่ 19 tracings (C) และ (D) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมสารลงใน reaction medium ให้มีความเข้มข้น 20 μ M และ 60 μ M จากนั้นเติม ADP + Pi พบว่า CU 763-14-10 จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration ลดลงเป็น 150.15, 100.10 natoms O / ml / min ตามลำดับ และเมื่อเติม DNP พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3u respiration ลดลงเป็น 147.37, 77.85 natoms O / ml / min ตามลำดับ

เมื่อเพิ่มขนาดของ CU 763-10-01, CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 จะทำให้มีผลยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียมากขึ้นทั้งใน state 3 และ 3u respiration นอกจากนี้ยังพบว่า CU 763-10-01 มีผลต่อ state 4 respiration ในขณะที่ CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 ไม่มีผลดังกล่าว โดยพบว่า CU 763-10-01 มี potency ในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียสูงกว่า CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 ในกรณีเดียวกัน CU 763-14-10 มี potency ในการยับยั้งกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียสูงกว่า CU 763-14-07 ที่ขนาด 20-40 μ M แต่ที่ขนาดตั้งแต่ 60 μ M ขึ้นไปจะให้ผลการยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 20)

3.2 ผลของ CU 763-10-01 และ CU 763-14-10 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

3.2.1 ผลของ CU 763-10-01 ขนาดต่างๆต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

3.2.1.1 ผลต่อเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดไม่จำเพาะเจาะจง

รูปที่ 21 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส โดย CU 763-10-01 ในขนาดต่างๆ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) 100 μ M เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ พบว่าเมื่อเริ่ม incubate ไมโตคอนเดรียใน sodium phosphate buffer pH 7.4 และ rotenone (respiratory chain inhibitor) เพื่อยับยั้งการใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย แล้วเริ่มวัดปริมาณออกซิเจน จะได้อัตราการใช้ออกซิเจนในระยะนี้ต่ำ (2.78 natoms O / ml / min) แต่เมื่อเติม tyramine ลงไป พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้น (33.36 natoms O / ml / min) แสดงถึงการใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ tyramine โดยเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรีย

เมื่อให้ขนาด CU 763-10-01 เพิ่มขึ้นเป็น 10, 500, 1,000 และ 2,000 μ M โดยให้ tyramine มีความเข้มข้นคงที่ (100 μ M) จะพบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียลดลงเป็น 27.80, 16.68, 11.12 และ 2.78 natoms O / ml / min ตามลำดับ ดังรูปที่ 21 tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงว่า CU 763-10-01 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ และความสามารถดังกล่าวจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CU 763-10-01

รูปที่ 22 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ของ CU 763-10-01 ที่ขนาดต่างๆ โดยคิดเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) เมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (control) พบว่าในช่วงความเข้มข้นต่ำที่ 10^{-6} ถึง 10^{-5} M มีการยับยั้งเอนไซม์เพียงเล็กน้อยไม่ถึงยี่สิบเปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10^{-4} M จะเพิ่มการยับยั้งเอนไซม์ขึ้นอย่างรวดเร็ว จนเป็นร้อยเปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 2×10^{-3} M

3.2.1.2 ผลต่อเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดเอ (MAO-A)

รูปที่ 23 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดเอ (MAO-A) โดย CU 763-10-01 ขนาดต่างๆ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A)

100 μM เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 25.02 natoms O / ml / min

tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงผลของ CU 763-10-01 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 50 , 100 , 1,000 และ 2,000 μM โดยให้ 5-hydroxytryptamine มีความเข้มข้นคงที่ (100 μM) จะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียลดลงเป็น 22.24, 16.68, 11.12 และ 5.56 natoms O / ml / min ตามลำดับเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (control) และความแรงในการยับยั้งดังกล่าวจะสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของ CU 763-10-01 โดยพบว่าที่ขนาดความเข้มข้น 5×10^{-3} M สามารถยับยั้ง MAO-A ได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 24

3.2.1.3 ผลต่อเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดบี (MAO-B)

รูปที่ 25 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดบี (MAO-B) โดย CU 763-10-01 ขนาดต่างๆ เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) 100 μM เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 16.68 natoms O / ml / min

tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงผลของ CU 763-10-01 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 10, 500, 1,000 และ 2,000 μM โดยให้ benzylamine มีความเข้มข้นคงที่ (100 μM) จะพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียลดลงเป็น 13.90, 11.12, 8.34 และ 2.78 natoms O / ml / min ตามลำดับเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (control) และความแรงในการยับยั้งดังกล่าวจะสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของ CU 763-10-01 โดยพบว่าที่ขนาดความเข้มข้น 2×10^{-3} M สามารถยับยั้ง MAO-B ได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 26

3.2.1.4 ผลความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้ง MAO โดย CU 763-10-01

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบผลของ CU 763-10-01 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์เมื่อใช้ tyramine, 5-hydroxytryptamine และ benzylamine เป็นสับสเตรท พบว่าสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ขนาด 1×10^{-5} M, 1×10^{-3} M และ 1×10^{-6} M ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งสมรรถนะของเอนไซม์ได้น้ำสิบเปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เมื่อใช้ benzylamine เป็นสับสเตรทมีค่าประมาณ 579 μM ในขณะที่เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine เป็นสับสเตรทมีค่าประมาณ 1,062 μM ซึ่งมีค่ามากกว่าประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 9) แสดงว่า

CU 763-10-01 สามารถยับยั้ง MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A เล็กน้อย แต่ไม่ถึงขนาดที่จำเพาะเจาะจง (selective) ต่อชนิดของเอนไซม์

3.2.2 ผลของ CU 763-14-10 ขนาดต่างๆต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

3.2.1.1 ผลต่อเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดไม่จำเพาะเจาะจง

รูปที่ 28 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย CU 763-14-10 ขนาดต่างๆ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) 100 μ M เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนเมื่อเติม tyramine เป็น 55.61 natoms O / ml / min และ tracing (B) แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย CU 763-14-10 ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสเมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท

เมื่อให้ขนาด CU 763-14-10 เพิ่มขึ้นเป็น 1, 5, 10 และ 20 μ M โดยให้ tyramine มีความเข้มข้นคงที่ (100 μ M) จะพบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียลดลงเป็น 33.36, 22.24, 16.58 และ 11.12 natoms O / ml / min ตามลำดับ ดังรูปที่ 28 tracings (C), (D), (E) และ (F) แสดงว่า CU 763-14-10 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้

รูปที่ 29 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ของ CU 763-14-10 ที่ขนาดต่างๆ โดยคิดเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) เมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (control) เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ จะเห็นว่า CU 763-14-10 สามารถยับยั้งได้เกือบร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} M ในขณะที่ CU 763-10-01 ต้องใช้ขนาดถึง 2×10^{-3} M

3.2.1.2 ผลต่อเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดเอ (MAO-A)

รูปที่ 30 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดเอ (MAO-A) โดย CU 763-14-10 ขนาดต่างๆ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) 100 μ M เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 38.92 natoms O / ml / min และ tracing (B) แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย CU 763-14-10 ในการทดลองนี้ ไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสเมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine เป็นสับสเตรท

ผลของ CU 763-14-10 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 10, 20 และ 50 μM โดยให้ 5-hydroxytryptamine มีความเข้มข้นคงที่ (100 μM) จะพบว่า CU 763-14-10 สามารถยับยั้งการทำงานของ MAO-A ในไมโทคอนเดรียได้ โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียลดลงเป็น 33.36, 27.80, 22.24 และ 16.68 $\text{natoms O / ml / min}$ ตามลำดับ (tracings (C), (D), (E) และ (F)) เมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (control) และความแรงในการยับยั้งดังกล่าวจะสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของ CU 763-14-10 โดยพบว่าที่ขนาดความเข้มข้น 2×10^{-3} M สามารถยับยั้ง MAO-A ได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 31

3.2.1.3 ผลต่อเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดบี (MAO-B)

รูปที่ 32 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดบี (MAO-B) โดย CU 763-14-10 ขนาดต่างๆ เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) 100 μM เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ พบว่ามีอัตราการใช้ออกซิเจนเป็น 25.02 $\text{natoms O / ml / min}$ และ tracing (B) แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย CU 763-14-10 ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสเมื่อใช้ benzylamine เป็นสับสเตรท

tracings (C), (D) และ (E) แสดงผลของ CU 763-14-10 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 5 และ 10 μM โดยให้ benzylamine มีความเข้มข้นคงที่ (100 μM) จะพบว่า CU 763-14-10 สามารถยับยั้งการทำงานของ MAO-B ในไมโทคอนเดรียได้ โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียลดลงเป็น 16.68, 11.12 และ 8.34 $\text{natoms O / ml / min}$ ตามลำดับเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (control) และความแรงในการยับยั้งดังกล่าวจะสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของ CU 763-14-10 เช่นเดียวกันโดยพบว่าที่ขนาดความเข้มข้นเพียง 1×10^{-4} M สามารถยับยั้ง MAO-B ได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 33

3.2.1.4 ผลความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้ง MAO โดย CU 763-14-10

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบผลของ CU 763-14-10 ต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส เมื่อใช้ tyramine, 5-hydroxytryptamine และ benzylamine เป็นสับสเตรท พบว่าสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ขนาด 10^{-6} M ในทุกสับสเตรท แต่ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งสมรรถนะของเอนไซม์ได้ห้าสิบเปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เมื่อใช้ benzylamine เป็นสับสเตรทมีค่าประมาณ 1.90 μM ในขณะที่เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine เป็นสับสเตรทมีค่าประมาณ 18.82 μM ซึ่งมีความมากกว่าประมาณ 10 เท่า (ตารางที่ 9) แสดงว่า CU 763-14-10

สามารถยับยั้ง MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A แต่ไม่ถึงขนาดที่จำเพาะเจาะจง (selective) ต่อชนิดของ เอนไซม์

3.3 ผลของ Irreversible inhibitors ต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

3.3.1 ผลของ clorgyline (selective MAO-A inhibitor) ต่อการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

รูปที่ 35 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย clorgyline ในขนาด 0.01, 0.1, 1.0, 10 และ 100 μM เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) 100 μM เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C), (D), (E) และ (F) แสดงการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ clorgyline ในขณะที่ความเข้มข้นของ tyramine คงที่ พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวมากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ clorgyline รูปที่ 36 แสดงการยับยั้ง MAO โดย clorgyline มีลักษณะเป็นขั้นบันได (biphasic inhibition) เนื่องจาก tyramine เป็นสับสเตรทที่ไม่จำเพาะเจาะจง สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ทั้ง MAO-A และ MAO-B ที่ความเข้มข้นต่ำ ($< 10^{-6}$ M) สามารถยับยั้งได้เฉพาะ MAO-A จึงเห็นผลการยับยั้งเอนไซม์ได้เพียงครั้งหนึ่ง แต่เมื่อความเข้มข้นของ clorgyline สูงขึ้น ($> 10^{-5}$ M) พบว่าสามารถยับยั้ง MAO-B ได้ด้วย จึงสามารถยับยั้งการออกซิไดซ์ tyramine ได้หมด

รูปที่ 37 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย clorgyline ในขนาด 0.01, 0.02, 0.1 และ 0.5 μM เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine 100 μM เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ clorgyline ในขณะที่ความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine คงที่ และจากรูปที่ 38 พบว่า clorgyline สามารถยับยั้ง MAO-A ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ร้อยละ 100 ด้วยความเข้มข้นเพียง 5×10^{-7} M

รูปที่ 39 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย clorgyline ในขนาด 1, 10, 100 และ 200 μM เมื่อใช้ benzylamine 100 μM เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ clorgyline ในขณะที่ความเข้มข้นของ benzylamine คงที่ พบว่า clorgyline สามารถยับยั้ง MAO-B ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้เช่นกัน แต่ความเข้มข้นต้องมากกว่า 10^{-5} M (รูปที่ 40)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง MAO-A และ MAO-B แตกต่างกันอย่างชัดเจน จากตารางที่ 6 สมรรถนะของเอนไซม์เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine เป็นสับสเตรทลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของ clorgyline ตั้งแต่ 1×10^{-8} M ในขณะที่สมรรถนะของเอนไซม์เมื่อใช้ benzylamine เป็นสับสเตรทพบว่าลดลงโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้น (1×10^{-9} - 2×10^{-4} M) เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} (ตารางที่ 9) ในการยับยั้งเอนไซม์ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine เป็นสับสเตรทเท่ากับ $0.12 \mu\text{M}$ ในขณะที่ใช้ benzylamine เป็นสับสเตรทมีค่าประมาณ $41 \mu\text{M}$ ซึ่งมากกว่ากันประมาณ 350 เท่า ความแตกต่างนี้สามารถเห็นได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 41)

3.3.2 ผลของ selegiline (selective MAO-B inhibitor) ต่อการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

รูปที่ 42 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย selegiline ขนาด 0.1, 1.0, 10 และ $100 \mu\text{M}$ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) $100 \mu\text{M}$ เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ selegiline ในขณะที่ความเข้มข้นของ tyramine คงที่ พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวมากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ selegiline รูปที่ 43 แสดงการยับยั้ง MAO โดย selegiline มีลักษณะเป็นขั้นบันได (biphasic inhibition) เนื่องจาก tyramine เป็นสับสเตรทที่ไม่จำเพาะเจาะจง สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ทั้ง MAO-A และ MAO-B ที่ความเข้มข้นต่ำ ($< 10^{-5}$ M) สามารถยับยั้งได้เฉพาะ MAO-B จึงเห็นผลการยับยั้งเอนไซม์ได้เพียงครั้งหนึ่ง แต่เมื่อความเข้มข้นของ selegiline สูงขึ้น ($> 10^{-5}$ M) พบว่าสามารถยับยั้ง MAO-A ได้ด้วย จึงสามารถยับยั้งการออกซิไดซ์ tyramine ได้หมด

รูปที่ 44 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย selegiline ขนาด 0.1, 1.0 และ $100 \mu\text{M}$ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine $100 \mu\text{M}$ เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C) และ (D) แสดงการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ selegiline ในขณะที่ความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine คงที่ และจากรูปที่ 45 พบว่า selegiline สามารถยับยั้ง MAO-A ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้เช่นกัน แต่ความเข้มข้นต้องมากกว่า 10^{-5} M

รูปที่ 46 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย selegiline ขนาด 0.01, 0.1, 0.5 และ $1.0 \mu\text{M}$ เมื่อใช้ benzylamine $100 \mu\text{M}$ เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงการยับยั้งเอนไซม์

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ selegiline ในขณะที่ความเข้มข้นของ benzylamine คงที่ รูปที่ 47 พบว่า selegiline สามารถยับยั้ง MAO-B ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวได้ร้อยละ 100 ด้วยความเข้มข้นเพียง 5×10^{-6} M

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง MAO-A และ MAO-B แตกต่างกันอย่างชัดเจน จากตารางที่ 7 สมรรถนะของเอนไซม์เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine เป็นสับสเตรทลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของ selegiline 1×10^{-7} M ขึ้นไป ในขณะที่สมรรถนะของเอนไซม์เมื่อใช้ benzylamine เป็นสับสเตรทลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของ selegiline ตั้งแต่ 1×10^{-9} M เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} (ตารางที่ 9) ในการยับยั้งเอนไซม์เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine เป็นสับสเตรทประมาณ 48 μ M ในขณะที่ใช้ benzylamine เป็นสับสเตรทมีค่าเท่ากับ 0.27 μ M ซึ่งมากกว่ากันประมาณสองร้อยเท่า ความแตกต่างนี้สามารถเห็นได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 48)

3.3.3 ผลของ pargyline (nonselective MAO inhibitor) ต่อการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

รูปที่ 49 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส โดย pargyline ขนาด 0.1, 1.0, 10 และ 100 μ M เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) 100 μ M เป็นสับสเตรท tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ pargyline ในขณะที่ความเข้มข้นของ tyramine คงที่ พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวมากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ pargyline รูปที่ 50 แสดงการยับยั้ง MAO โดย pargyline เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท พบว่ามีลักษณะคล้ายกับเมื่อถูกยับยั้งด้วย clorgyline และ selegiline แต่ไม่สามารถแยกเป็นสองชั้นได้อย่างชัดเจน

รูปที่ 51 และ 53 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย pargyline ขนาด 0.1, 1.0, 10 และ 100 μ M เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine และ benzylamine 100 μ M เป็นสับสเตรทตามลำดับ tracing (A) แสดงสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในสภาวะปกติ tracings (B), (C), (D) และ (E) แสดงการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ pargyline ในขณะที่ความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine และ benzylamine คงที่ พบว่า pargyline ซึ่งเป็น nonspecific inhibitor ออกฤทธิ์ยับยั้งแอกติวิตี้ของ MAO-B ได้มากกว่า MAO-A กล่าวคือที่ขนาด 1×10^{-6} M ยับยั้ง MAO-A ได้เพียงร้อยละสามสิบ ในขณะที่สามารถยับยั้ง MAO-B ได้เกือบร้อยละ 100

ความสามารถในการยับยั้ง MAO-A และ MAO-B โดย pargyline ซึ่งเป็น nonspecific inhibitor เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} (ตารางที่ 9) พบว่าต่างกันประมาณสี่สิบเท่า และค่อนข้างที่จะยับยั้ง MAO-B ได้มากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบความแรงในการยับยั้งเอนไซม์ จากรูปที่ 56 - 58 และจากค่า IC_{50} (ตารางที่ 9) พบว่า CU 763-14-10 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้แรงกว่า CU 763-10-01 ในขณะที่การยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B พบว่ามีความแรงใกล้เคียงกับ pargyline

3.4 Kinetics inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 และ CU 763-14-10

3.4.1 Kinetics inhibition โดย CU 763-10-01

3.4.1.1 Kinetics inhibition แบบไม่จำเพาะเจาะจงโดย CU 763-10-01

รูปที่ 59 tracings (A)-(F) แสดง kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) เป็นสับสเตรท พบว่าในกรณีที่ไม่มีกการยับยั้งเอนไซม์ (control) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ tyramine เป็น 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,200 μM อัตราการใช้ออกซิเจนจะค่อยๆเพิ่มมากขึ้นเป็น 27.80, 47.27, 66.73, 72.29, 88.98 และ 97.32 $\text{natoms O / ml / min}$ ตามลำดับ แสดงว่าความเร็วต้น (initial velocity, v) ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นของความเร็วต้นนี้จะลดลงได้ ถ้าความเข้มข้นของสับสเตรทเพิ่มสูงมาก เนื่องจากเกิดการอิ่มตัวของเอนไซม์

รูปที่ 71 tracings (A)-(F) แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ CU 763-14-10 ไม่มีผลต่อ kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) เป็นสับสเตรท

รูปที่ 60 tracings (A)-(F) แสดง kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 ในขนาด 1.0 mM เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) เป็นสับสเตรทที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,200 μM เช่นเดียวกัน พบว่าความเร็วต้น (initial velocity, v) ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้เมื่อเพิ่มขนาดของ tyramine โดยอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นจาก 11.12 เป็น 16.68, 22.24, 33.36 และ 38.92 $\text{natoms O / ml / min}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 10 และรูปที่ 61 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของ tyramine ในสภาวะที่ไม่มีตัวยับยั้ง(control)และในสภาวะที่ถูกยับยั้งด้วย

CU 763-10-01 ขนาด 0.5 และ 1.0 mM พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์ลดลงจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นของ tyramine จากนั้นเมื่อนำมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูป double reciprocal plot (รูปที่ 62) จะได้เส้นตรงสามเส้นมีลักษณะตัดกันที่แกน $1/v$ โดยความชันของเส้นตรงจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CU 763-10-01 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว มีผลทำให้ค่าคงที่ของ Michaelis (K_m) มากขึ้น (ตารางที่ 16) แต่ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (v_{max}) ไม่เปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 17) แสดงว่าเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) (ดูภาคผนวก)

3.4.1.2 Kinetics inhibition ของ MAO-A โดย CU 763-10-01

รูปที่ 63 tracings (A)-(E) แสดง kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท พบว่าในขณะที่ไม่มีการยับยั้งเอนไซม์ (control) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine เป็น 25, 50, 100, 250 และ 500 μM อัตราการใช้ออกซิเจนจะค่อยๆเพิ่มมากขึ้น จาก 13.90 เป็น 16.68, 22.24, 33.36 และ 36.14 $\text{natoms O} / \text{ml} / \text{min}$ ตามลำดับ แสดงว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine เช่นเดียวกับกรณีของ tyramine

รูปที่ 72 tracings (A)-(E) แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ CU 763-14-10 ไม่มีผลต่อ kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท

รูปที่ 64 tracings (A)-(E) แสดง kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 ในขนาด 1.0 mM เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรทที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 μM เช่นเดียวกัน พบว่าผลการยับยั้งเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มขนาดของ 5-hydroxytryptamine โดยอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นจาก 5.56 เป็น 5.56, 11.12, 22.24 และ 25.02 $\text{natoms O} / \text{ml} / \text{min}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 11 และรูปที่ 65 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์ลดลงจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine เมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ขนาด 1.0 mM ในขณะที่ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 ต่ำๆ คือ 0.5 mM พบความแตกต่างของความเร็วต้นจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine เป็น

25 และ 500 μM เท่านั้น แต่ที่ความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine เป็น 50, 100 และ 250 μM พบความแตกต่างของความเร็วต้นจากสภาวะปกติเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูป double reciprocal plot (รูปที่ 66) จะได้เส้นตรงสามเส้นมีลักษณะเกือบจะตัดกันที่แกน $1/v$ โดยความชันของเส้นตรงจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CU 763-10-01 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว มีผลทำให้ค่าคงที่ของ Michaelis (K_m) เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 16) แต่ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (v_{max}) ไม่เปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 17) แสดงว่าการยับยั้ง MAO-A ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 เป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

3.4.1.3 Kinetics inhibition ของ MAO-B โดย CU 763-10-01

รูปที่ 67 tracings (A)-(F) แสดง kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท พบว่าในขณะที่ไม่มีการยับยั้งเอนไซม์ (control) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ benzylamine เป็น 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,200 μM อัตราการใช้ออกซิเจนจะค่อยๆเพิ่มมากขึ้นจาก 22.24 เป็น 33.36, 38.92, 44.49, 52.83 และ 63.95 $\text{natoms O / ml / min}$ ตามลำดับ แสดงว่าอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ benzylamine เช่นเดียวกับกรณีของ tyramine และ 5-hydroxytryptamine

รูปที่ 73 tracings (A)-(F) แสดงให้เห็นว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของ CU 763-14-10 ไม่มีผลต่อ kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

รูปที่ 68 tracings (A)-(F) แสดง kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 ในขนาด 1.0 mM เมื่อใช้ benzylamine เป็นสับสเตรทที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 μM เช่นเดียวกัน พบว่าผลการยับยั้งเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มขนาดของ benzylamine โดยอัตราการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นจาก 5.56 เป็น 5.56, 11.12, 16.68, 22.24 และ 27.80 $\text{natoms O / ml / min}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 12 และรูปที่ 69 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของ benzylamine พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์ลดลงจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นของ benzylamine เช่นเดียวกับกรณีของ MAO-A เมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ขนาด 1.0 mM ในขณะที่ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 ต่ำๆ คือ 0.5 mM พบความแตกต่างของความเร็วต้นจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นของ

benzylamine เป็น 50, 800 และ 1,200 μM เท่านั้น พบความแตกต่างของความเร็วต้นจากสภาวะปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูป double reciprocal plot (รูปที่ 70) จะได้เส้นตรงสามเส้นมีลักษณะตัดกันที่แกน $1/v$ โดยความชันของเส้นตรงจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CU 763-10-01 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว มีผลทำให้ค่าคงที่ของ Michaelis (K_m) เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 16) แต่ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (v_{max}) ไม่เปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 17) แสดงว่าการยับยั้ง MAO-B ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 มีแนวโน้มเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

3.4.2 Kinetics inhibition โดย CU 763-14-10

3.4.2.1 Kinetics inhibition แบบไม่จำเพาะเจาะจงโดย CU 763-14-10

รูปที่ 74 tracings (A)-(F) แสดงผลของการเพิ่มความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate) การยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 ขนาด 20 μM เมื่อใช้สับสเตรทที่ความเข้มข้นเช่นเดียวกับสภาวะปกติ (รูปที่ 59 tracings (A)-(F)) พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ tyramine

ตารางที่ 13 และรูปที่ 75 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของ tyramine ในสภาวะที่ไม่มีตัวยับยั้ง (control) เปรียบเทียบกับเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ขนาด 20 μM พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์ลดลงจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นของ tyramine ส่วนที่ขนาดของ CU 763-14-10 เป็น 10 μM เมื่อความเข้มข้นของ tyramine เป็น 100 และ 200 μM เท่านั้นที่จะ พบความแตกต่างของความเร็วต้นจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ขนาดของ CU 763-14-10 เป็น 5 μM เมื่อความเข้มข้นของ tyramine เป็น 50, 100 และ 200 μM พบว่าความเร็วต้นจะเพิ่มขึ้นมีค่าใกล้เคียงกับภาวะปกติ และที่ความเข้มข้นของ tyramine เป็น 400, 800 และ 1,200 μM พบว่าความเร็วต้นจะเพิ่มขึ้นสูงขึ้นกว่าภาวะปกติ

รูปที่ 76 แสดง double reciprocal plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ tyramine ($1/s$) กับส่วนกลับของความเร็วต้น ($1/v$) พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ที่ขนาด 5 μM มีลักษณะเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (ค่า K_m เพิ่มขึ้น แต่ v_{max} ไม่เปลี่ยนแปลง) เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 10 และ 20 μM น่าจะมีลักษณะเป็นการยับยั้งแบบผสม (mixed inhibition)

3.4.2.2 Kinetics inhibition ของ MAO-A โดย CU 763-14-10

รูปที่ 77 tracings (A)-(E) แสดงผลของการเพิ่มความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ต่อการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 ขนาด 20 μM เมื่อใช้สับสเตรทที่ความเข้มข้นเช่นเดียวกันกับสภาวะปกติ (รูปที่ 63 tracings (A)-(E)) พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine เช่นกัน

ตารางที่ 14 และรูปที่ 78 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine ในสภาวะที่ไม่มีตัวยับยั้ง (control) เปรียบเทียบกับเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ขนาด 20 μM พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์ลดลงจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine ส่วนที่ขนาดของ CU 763-14-10 เป็น 10 μM เมื่อความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine เป็น 25 μM เท่านั้นที่จะ พบความแตกต่างของความเร็วต้นจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ขนาดของ CU 763-14-10 เป็น 5 μM เมื่อความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine ให้สูงขึ้น พบว่าความเร็วต้นจะเพิ่มขึ้นจนเกือบเท่ากับภาวะปกติ

รูปที่ 79 แสดง double reciprocal plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ tyramine (1/s) กับส่วนกลับของความเร็วต้น (1/v) พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ที่ขนาด 5 และ 10 μM มีลักษณะเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (ค่า K_m เพิ่มขึ้น แต่ v_{max} ไม่เปลี่ยนแปลง) เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 20 μM น่าจะมีลักษณะเป็นการยับยั้งแบบ non-competitive inhibition (v_{max} ลดลง แต่ K_m ไม่เปลี่ยนแปลง)

3.4.2.3 Kinetics inhibition ของ MAO-B โดย CU 763-14-10

รูปที่ 80 tracings (A)-(F) แสดงผลของการเพิ่มความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ต่อการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 ขนาด 20 μM เมื่อใช้สับสเตรทที่ความเข้มข้นเช่นเดียวกันกับสภาวะปกติ (รูปที่ 67 tracings (A)-(F)) พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ benzylamine เช่นกัน

ตารางที่ 15 และรูปที่ 81 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของ benzylamine ในสภาวะที่ไม่มีตัวยับยั้ง (control) เปรียบเทียบกับเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ขนาด 20 μM พบว่าความเร็วต้นของเอนไซม์ลดลงจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นของ benzylamine ส่วนที่ขนาดของ CU 763-14-10 เป็น 10 μM

เมื่อความเข้มข้นของ benzylamine เป็น 50, 100, 200 และ 400 μM เท่านั้นที่จะ พบความแตกต่างของ ความเร็วต้นจากสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ขนาดของ CU 763-14-10 เป็น 5 μM เมื่อ ความเข้มข้นของ benzylamine ให้สูงขึ้น พบว่าความเร็วต้นจะเพิ่มขึ้นจนเกือบเท่ากับภาวะปกติ

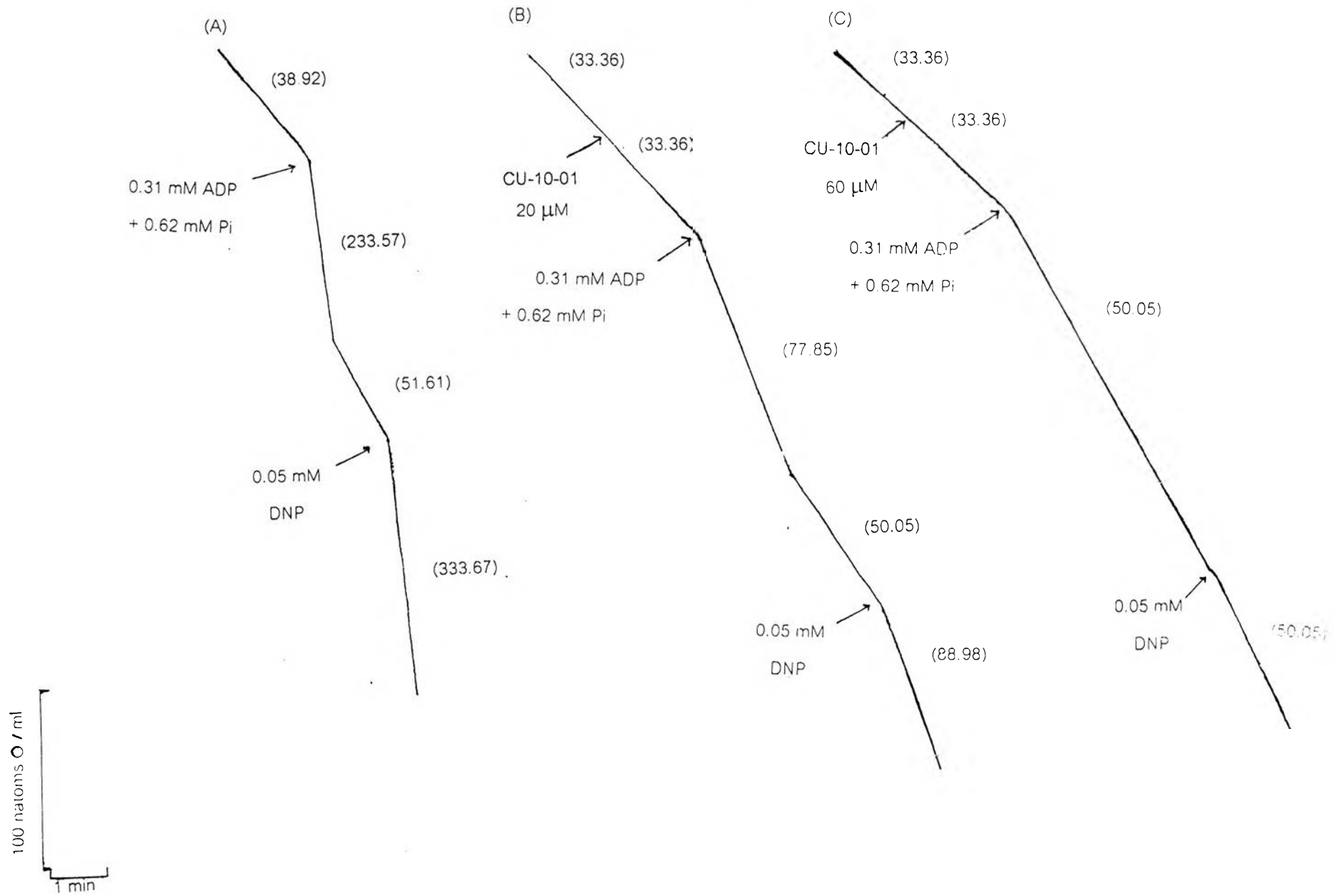
รูปที่ 82 แสดง double reciprocal plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้น ของ tyramine ($1/s$) กับส่วนกลับของความเร็วต้น ($1/v$) พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสใน ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 มีลักษณะเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

รูปและตารางประกอบผลการวิจัย

รูปที่ 17 Oxygraph tracings แสดงผลของ CU 763-10-01 ต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.50 mM (pH 7.2), $MgCl_2$ 1.88 mM, KCl 86.25 mM, potassium glutamate 5.21 mM + potassium malate 5.21 mM, sucrose 13.02 mM และไมโตคอนเดรีย 2.54 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP 0.31 mM+Pi 0.62 mM, DNP 0.05 mM และ CU 763-10-01 ขนาด 20 และ 60 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

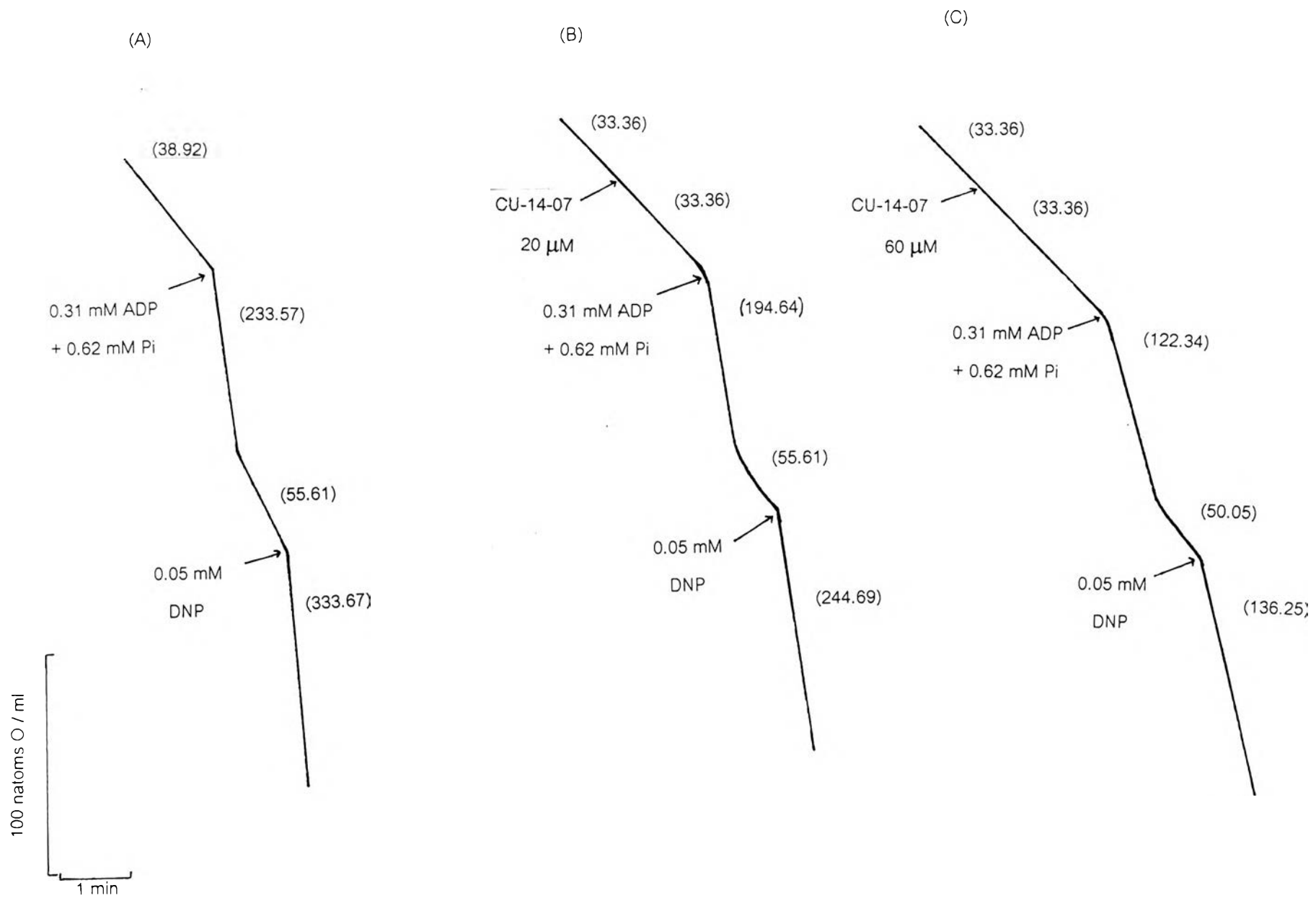
ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที



รูปที่ 18 Oxygraph tracings แสดงผลของ CU 763-14-07 ต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.50 mM (pH 7.2), $MgCl_2$ 1.88 mM, KCl 86.25 mM, potassium glutamate 5.21 mM + potassium malate 5.21 mM, sucrose 13.02 mM และไมโตคอนเดรีย 2.54 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP 0.31 mM+Pi 0.62 mM, DNP 0.05 mM และ CU 763-14-07 ขนาด 20 และ 60 μ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

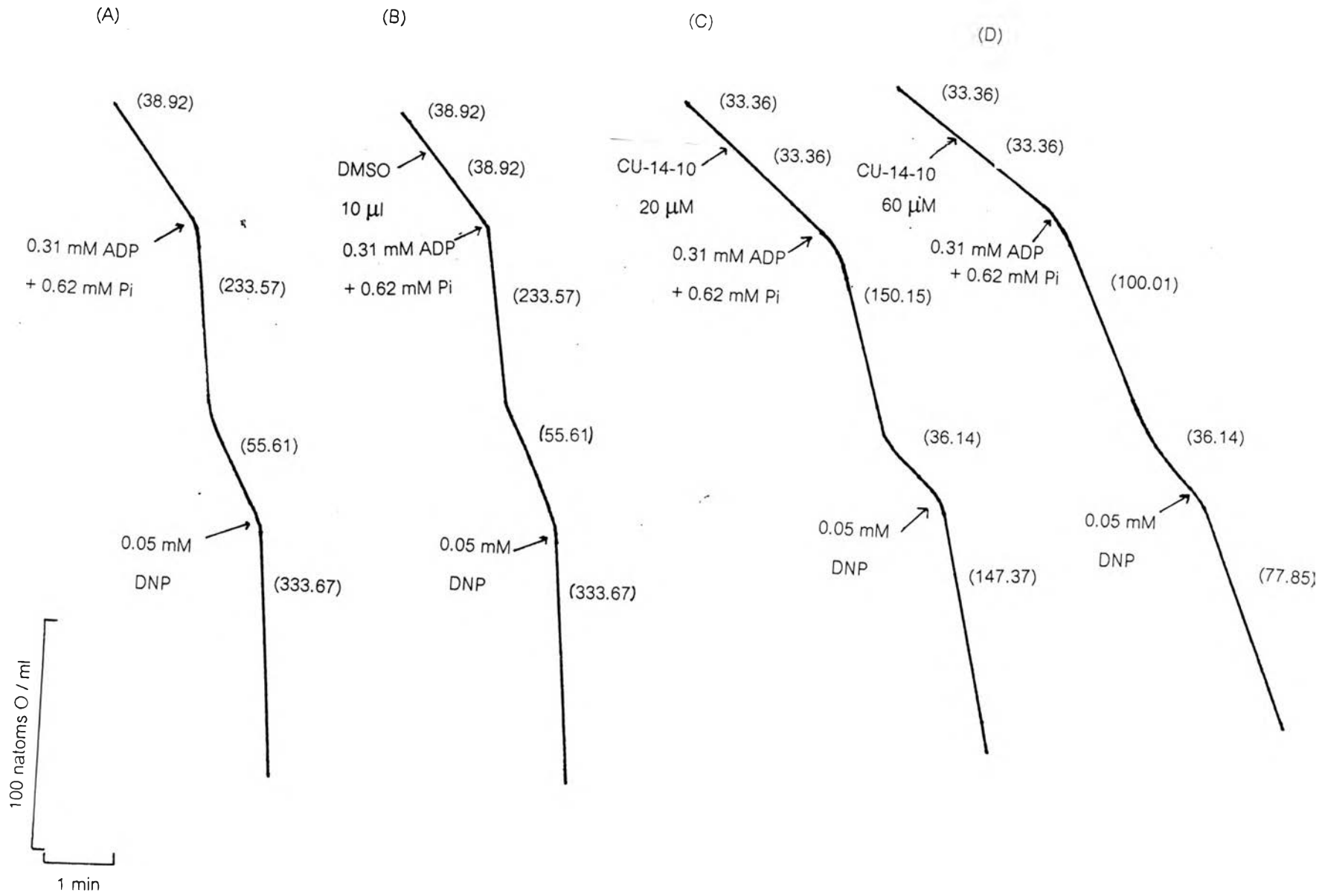
ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

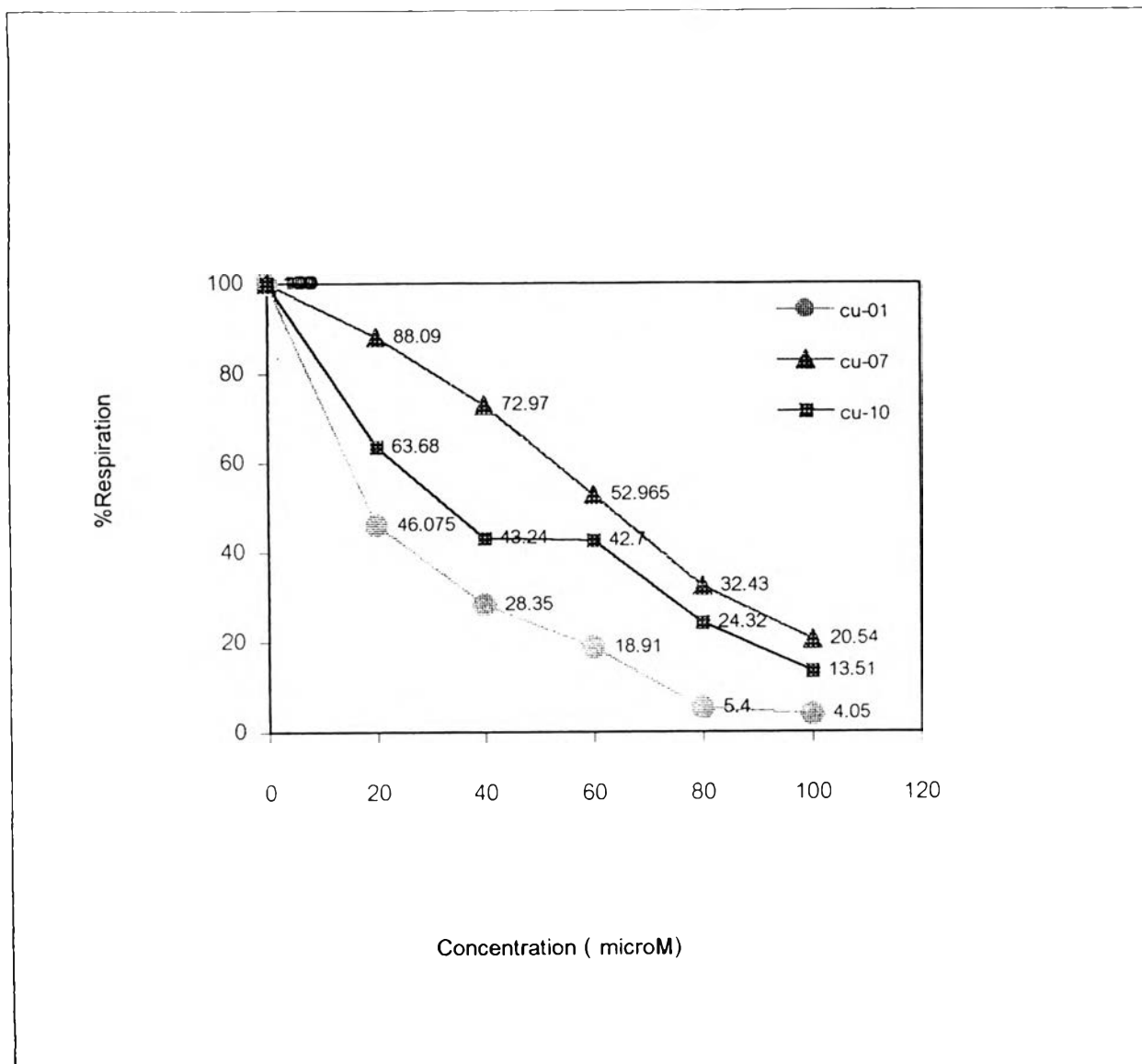


รูปที่ 19 Oxygraph tracings แสดงผลของ CU 763-14-10 ต่ออัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.50 mM (pH 7.2), $MgCl_2$ 1.88 mM, KCl 86.25 mM, potassium glutamate 5.21 mM + potassium malate 5.21 mM, sucrose 13.02 mM และไมโตคอนเดรีย 2.54 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ ADP 0.31 mM+Pi 0.62 mM, DNP 0.05 mM และ CU 763-14-10 ขนาด 20 และ 60 μM ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO รวมปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





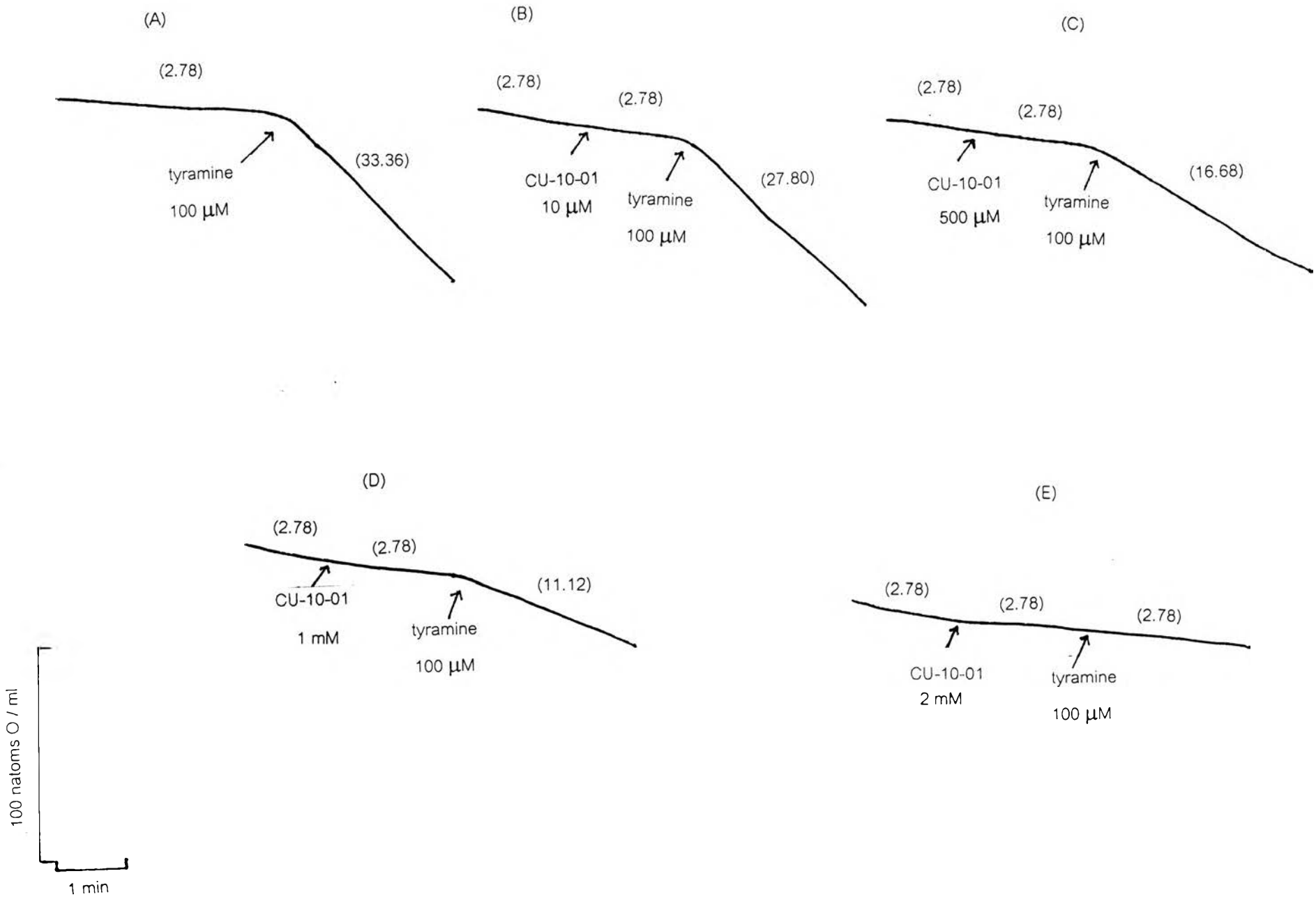
รูปที่ 20 แสดงการยับยั้ง state 3 respiration ของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01, CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 เมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรท

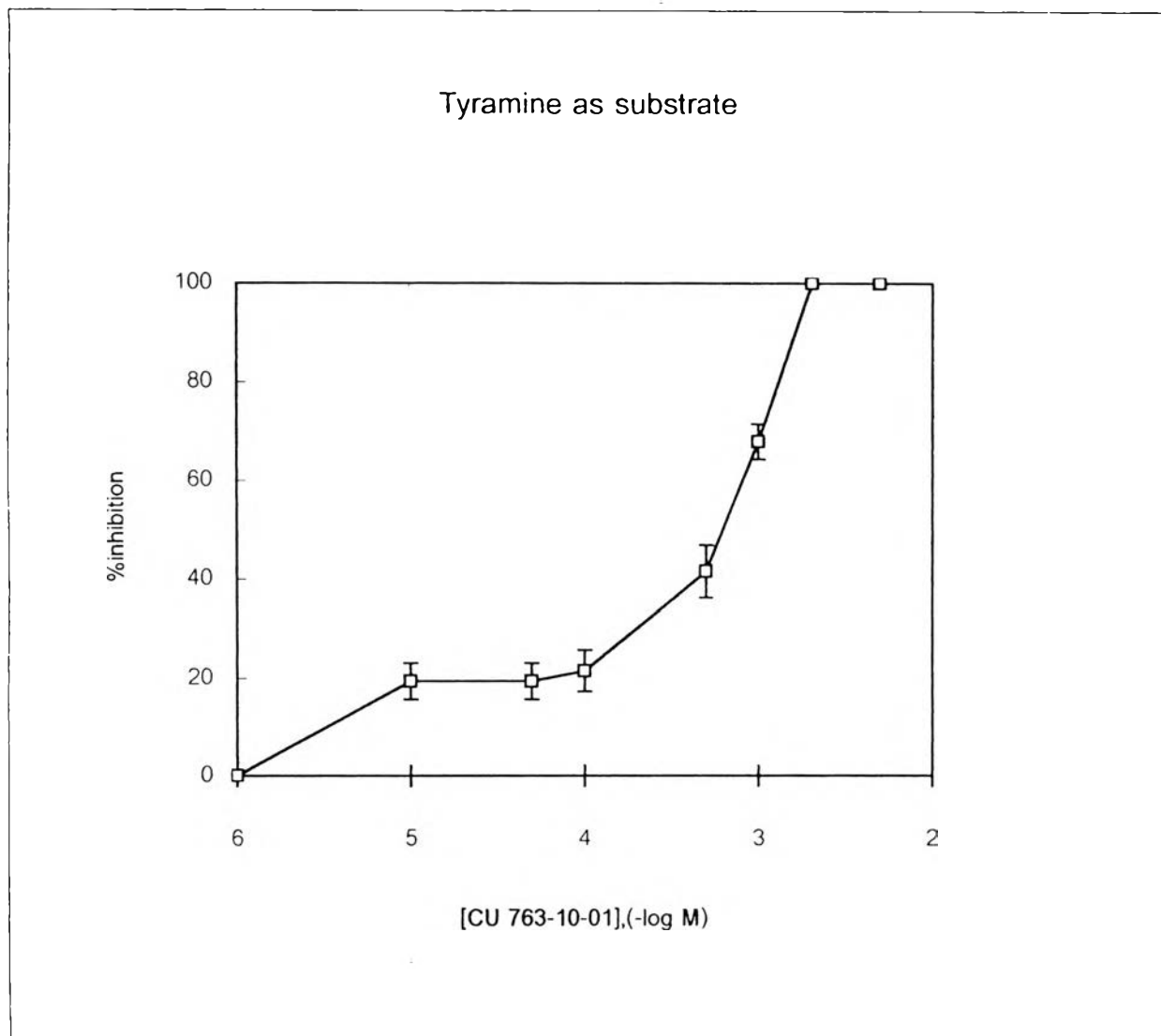
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : HEPES buffer 37.50 mM (pH 7.2), $MgCl_2$ 1.88 mM, KCl 86.25 mM, potassium glutamate 5.21 mM + potassium malate 5.21 mM, sucrose 13.02 mM, ADP 0.31 mM+Pi 0.62 mM, DNP 0.05 mM, ไมโตคอนเดรีย 2.54 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-10-01, CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 ที่ใช้คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 μM ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 21 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจาก
ตับหนูขาว โดย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate
dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone
10 μ g และไมโตคอนเดรีย 2.79 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ
CU 763-10-01 และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





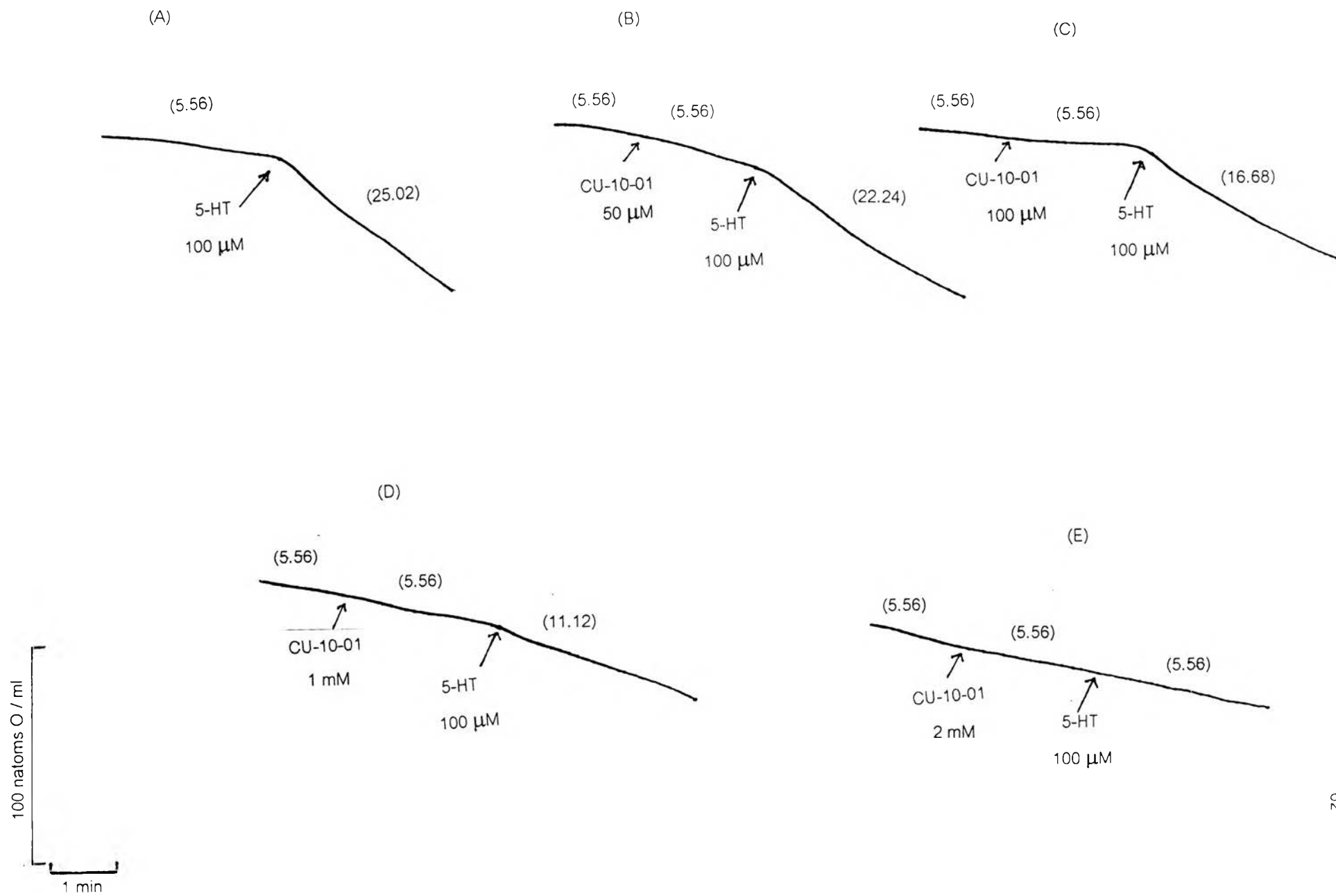
รูปที่ 22 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01 เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

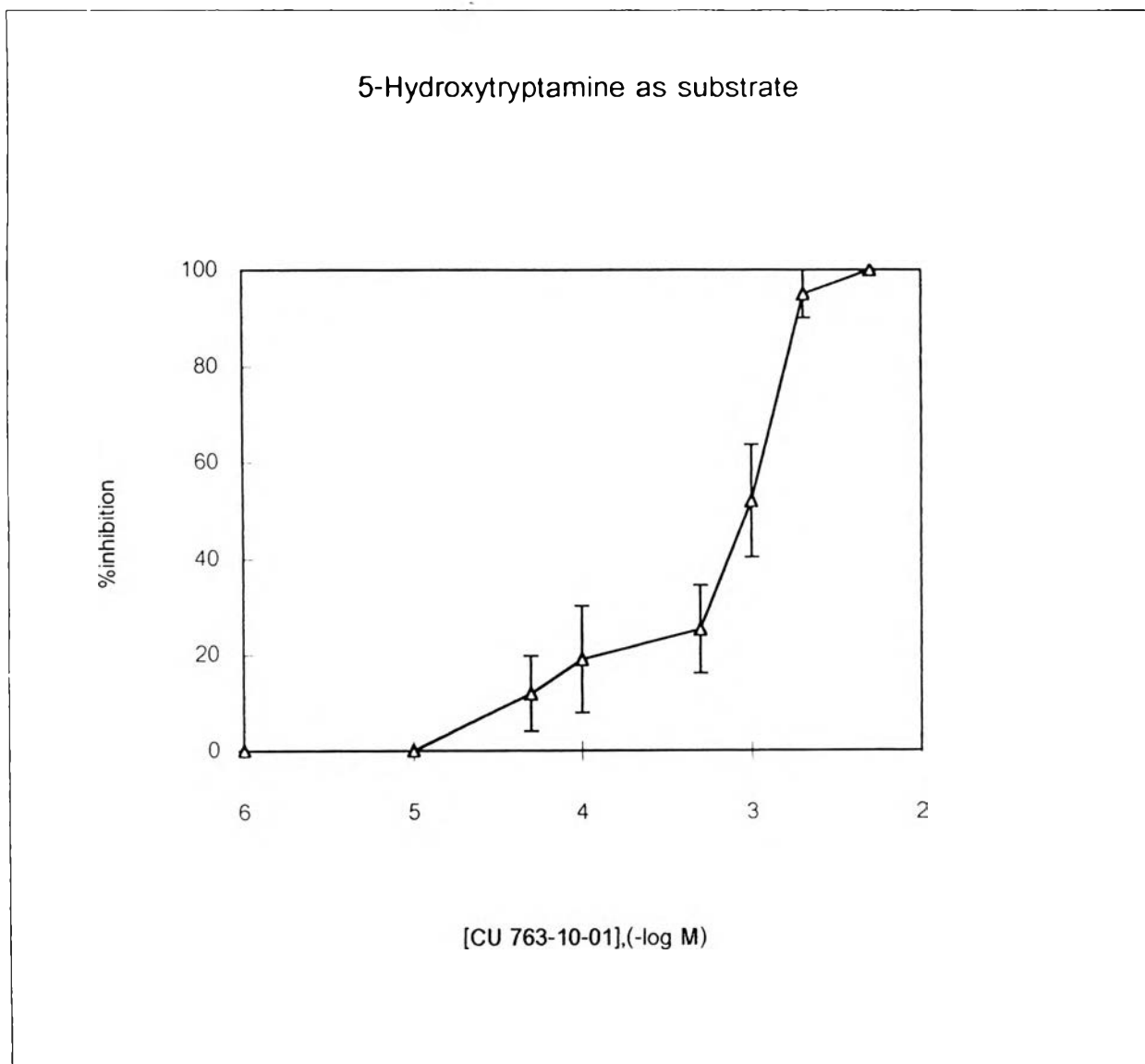
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 5×10^{-3} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 23 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 2.79 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-10-01 และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล. นาที





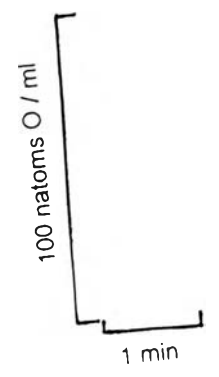
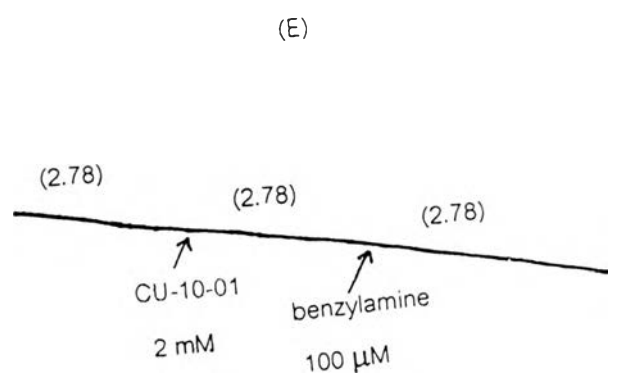
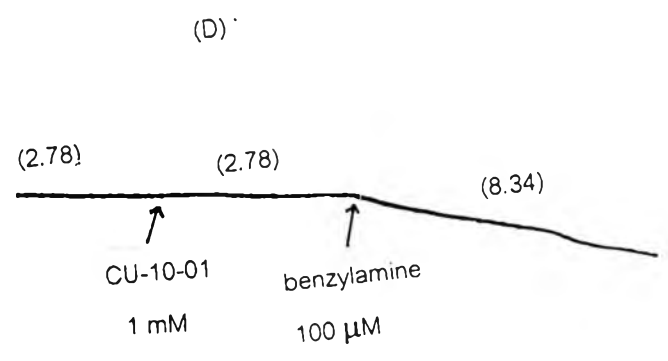
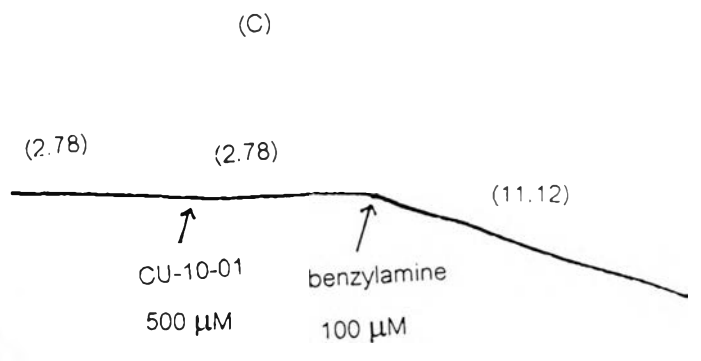
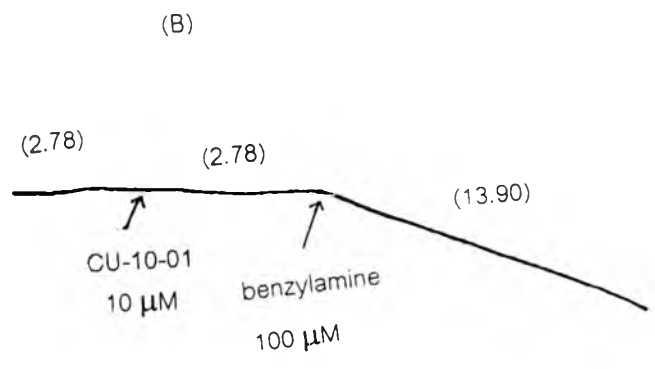
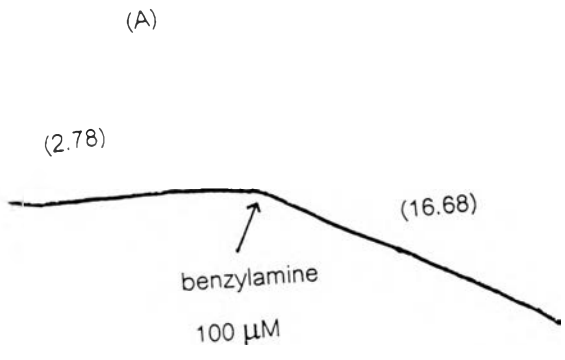
รูปที่ 24 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01 เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็น สับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

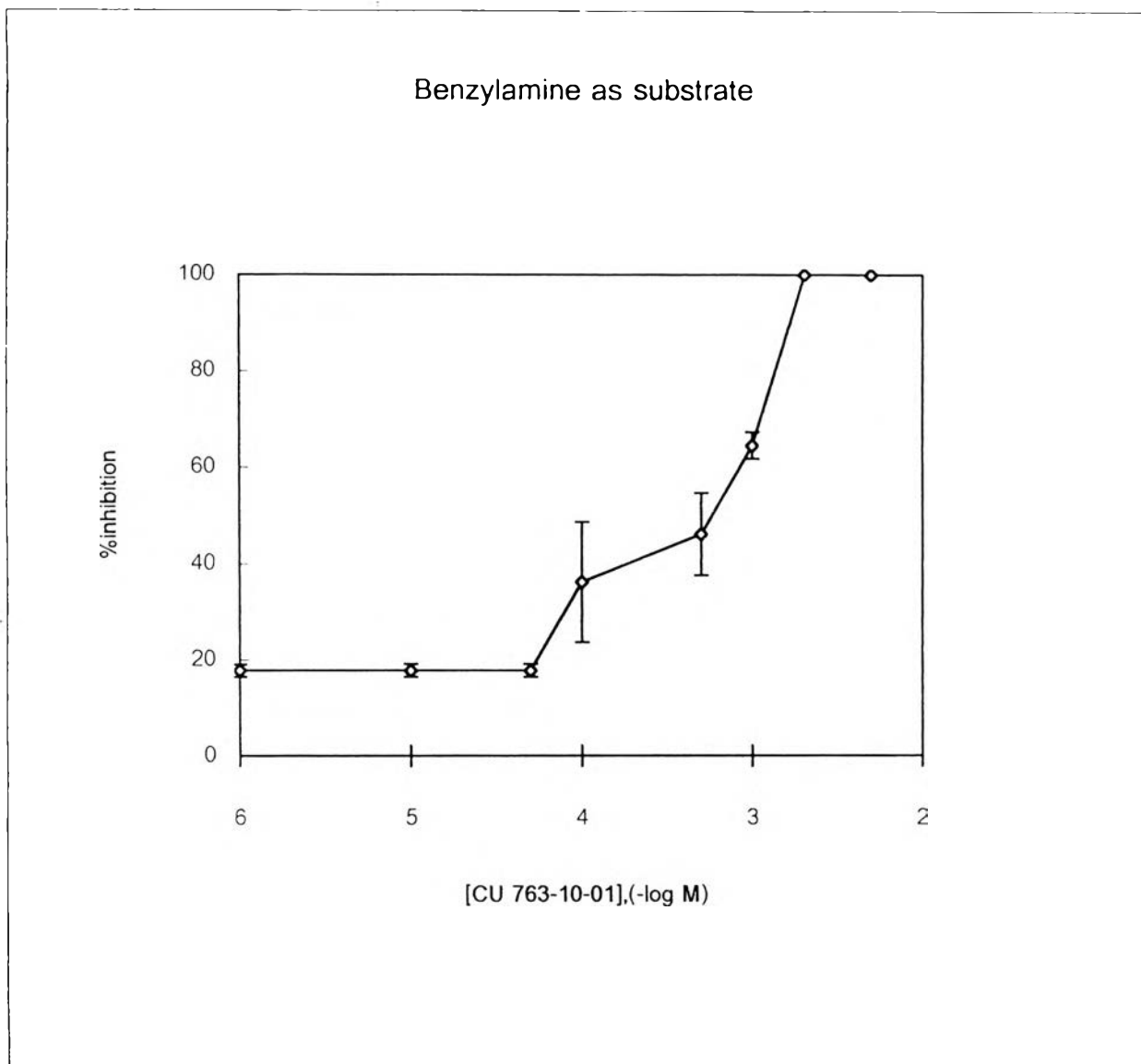
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 100 μM และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 มก.โปรตีนมล. ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 5×10^{-3} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 25 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 2.39 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-10-01 และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





รูปที่ 26 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01 เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 5×10^{-3} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

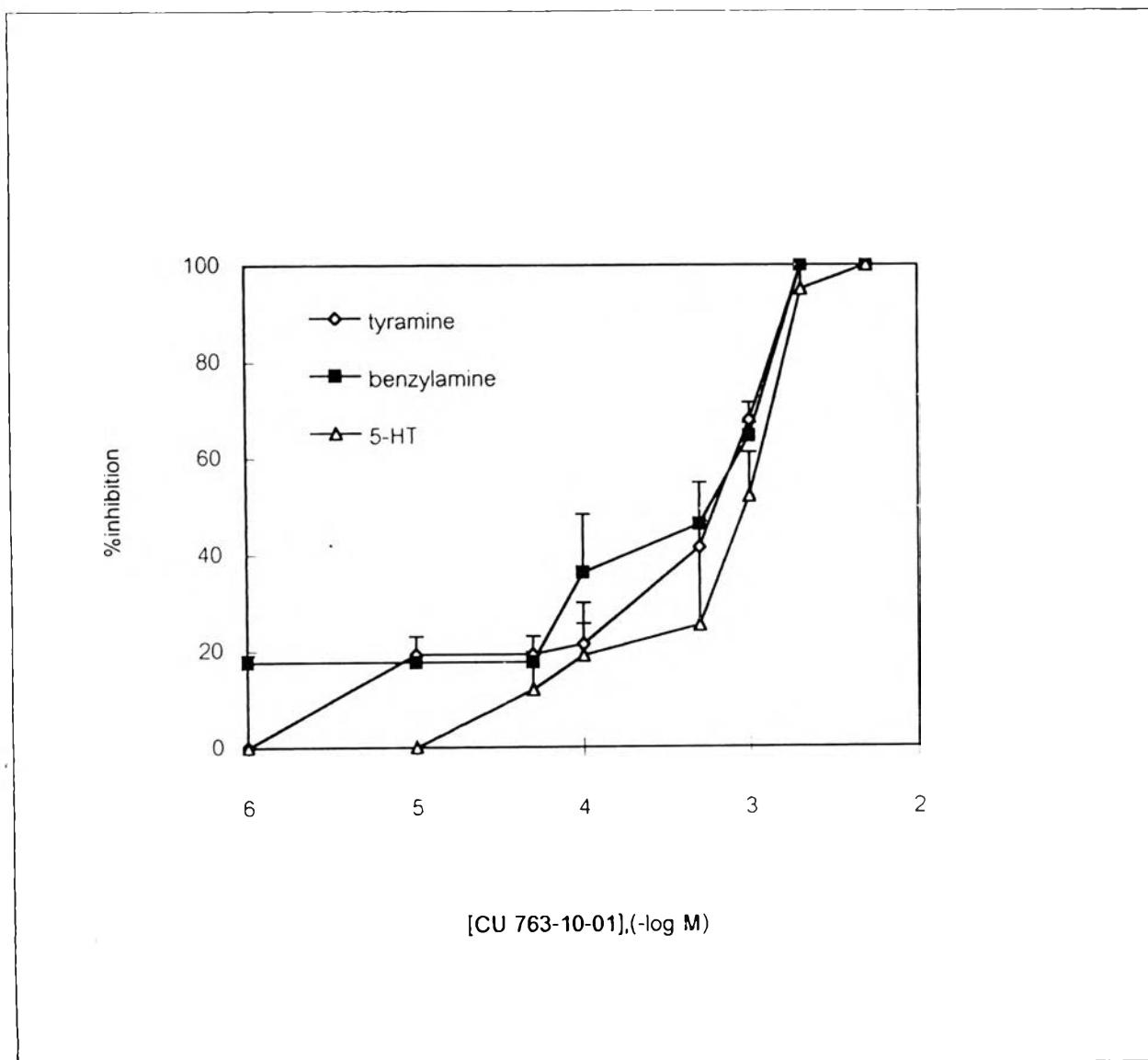
ตารางที่ 4

ผลของ CU 763-10-01 ต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

CU 763-10-01 (M)	MAO activities (natoms O / min / mg protein)		
	Tyramine (Both types)	5-Hydroxytryptamine (MAO-A)	Benzylamine (MAO-B)
Control	14.25 ± 0.74	5.56 ± 0.64	5.89 ± 0.38
1x10 ⁻⁶	14.25 ± 0.74	5.65 ± 0.64	4.86 ± 0.38*
1x10 ⁻⁵	11.48 ± 0.62*	5.65 ± 0.64	4.86 ± 0.38*
5x10 ⁻⁵	11.48 ± 0.62*	4.86 ± 0.38	4.86 ± 0.38*
1x10 ⁻⁴	11.08 ± 0.38*	4.36 ± 0.14	3.64 ± 0.59*
5x10 ⁻⁴	8.20 ± 0.31*	4.07 ± 0.22	3.08 ± 0.37*
1x10 ⁻³	4.53 ± 0.28*	2.51 ± 0.36*	2.07 ± 0.12*
2x10 ⁻³	0.00 ± 0.00*	0.22 ± 0.22*	0.00 ± 0.00*
5x10 ⁻³	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 µg, ความเข้มข้นของสับสเตรท 100 µM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 ที่ใช้ตั้งแต่ 1x10⁻⁶- 5x10⁻³ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



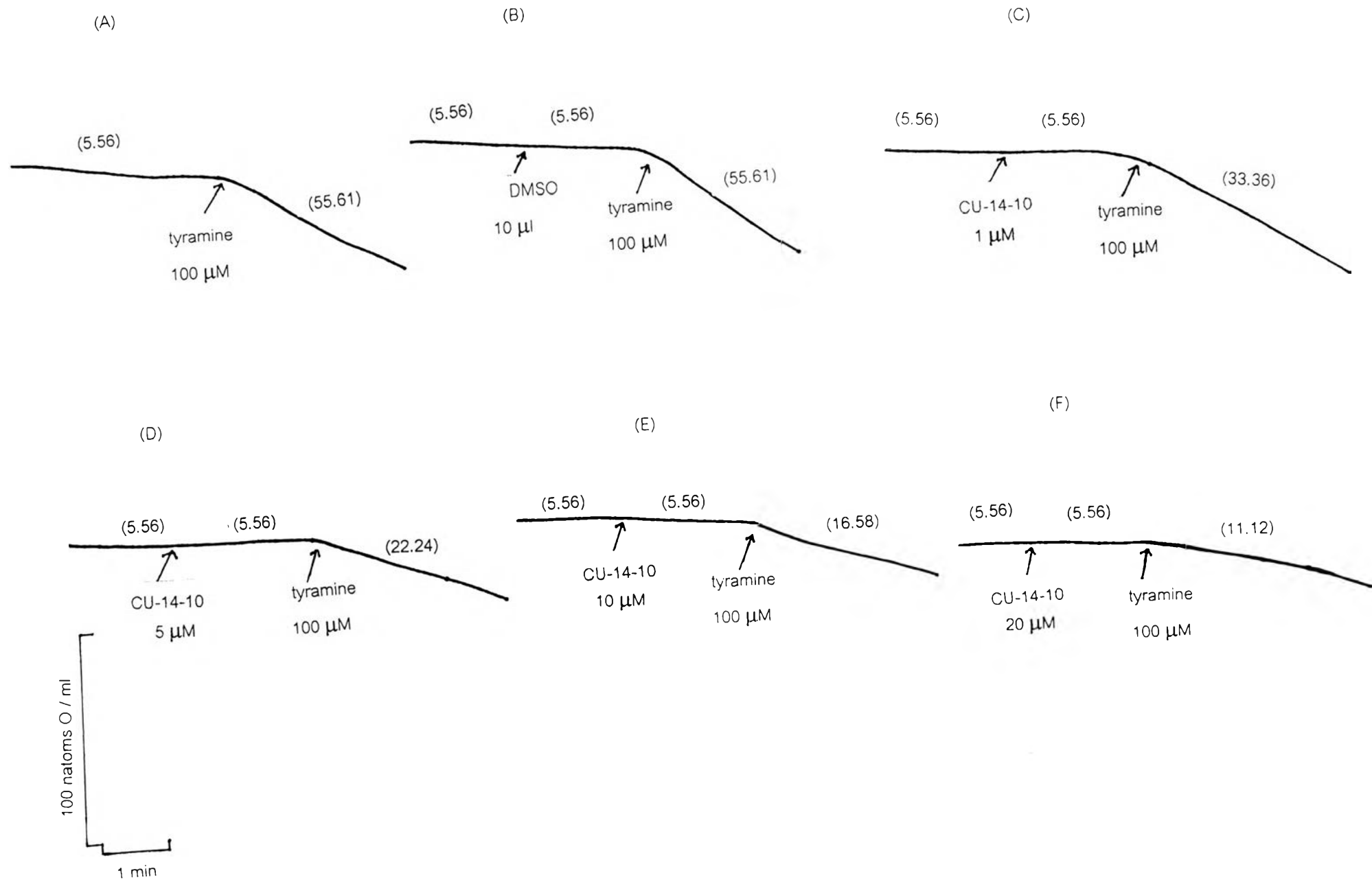
รูปที่ 27 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01 เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

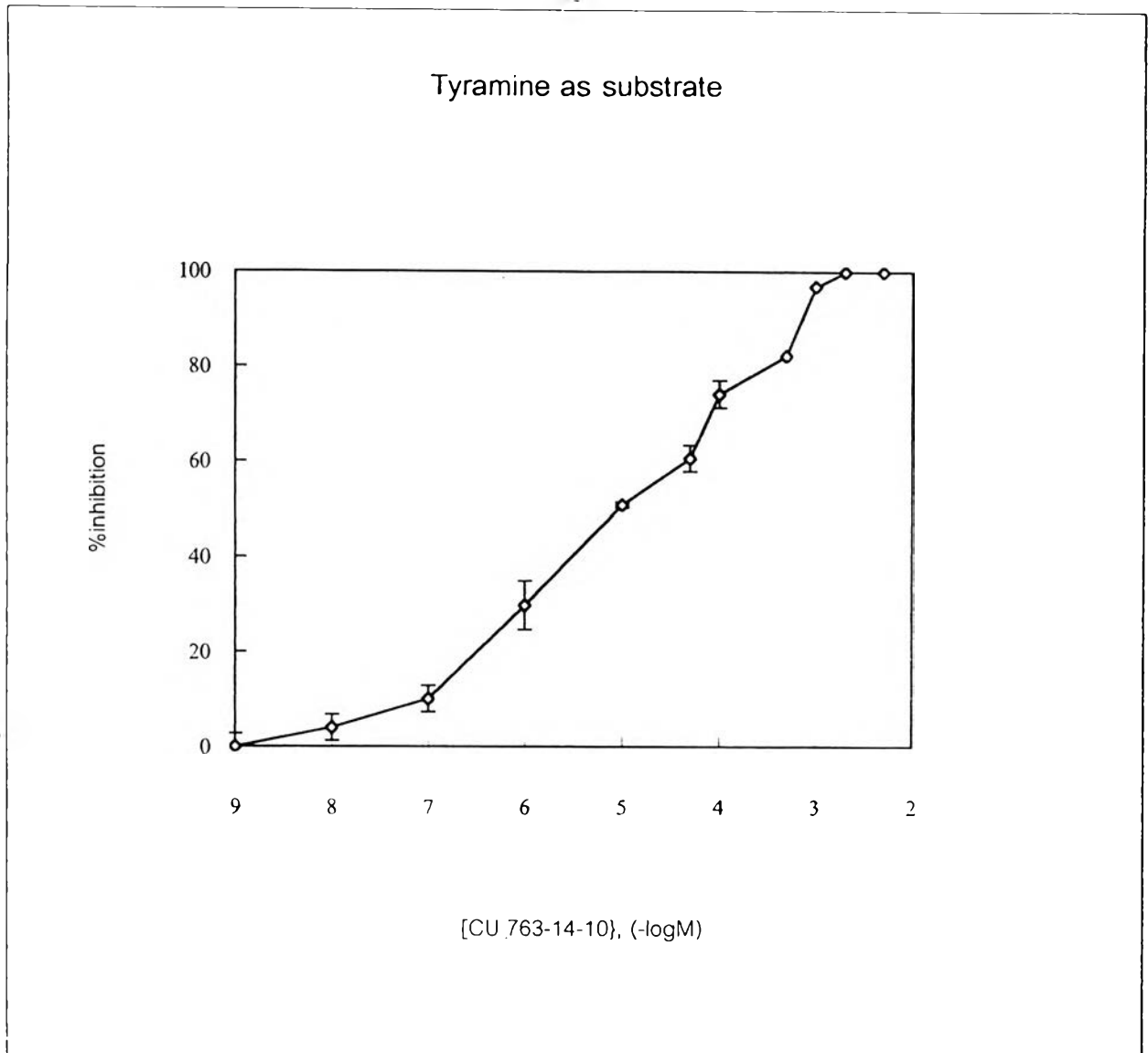
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, สับสเตรทที่ใช้ในแต่ละการทดลอง 100 μ M และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 มก./โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 5×10^{-3} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 28 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจาก
ตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate
dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone
10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.50 มก.โปรตีน/มล.ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU
763-14-10 ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





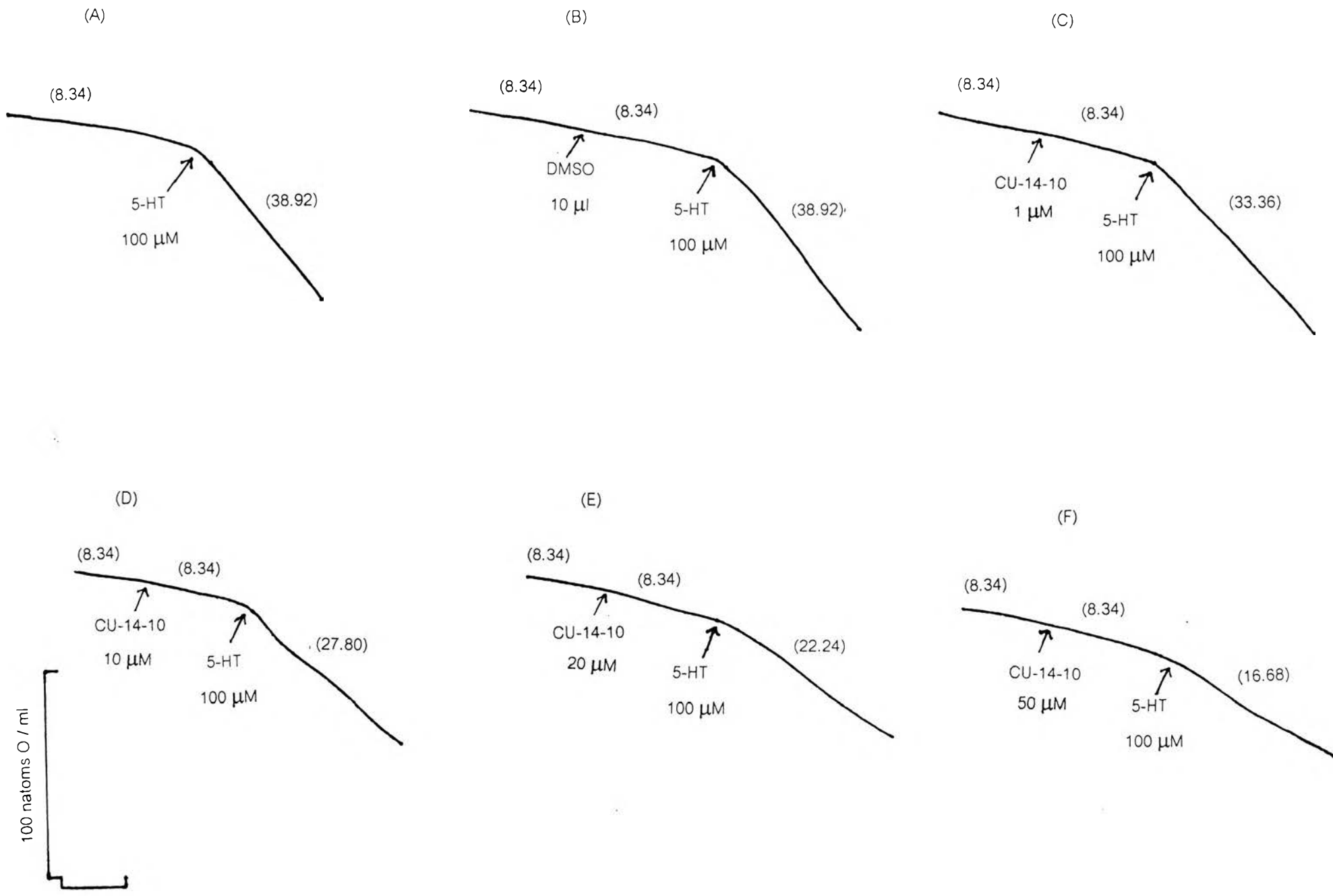
รูปที่ 29 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

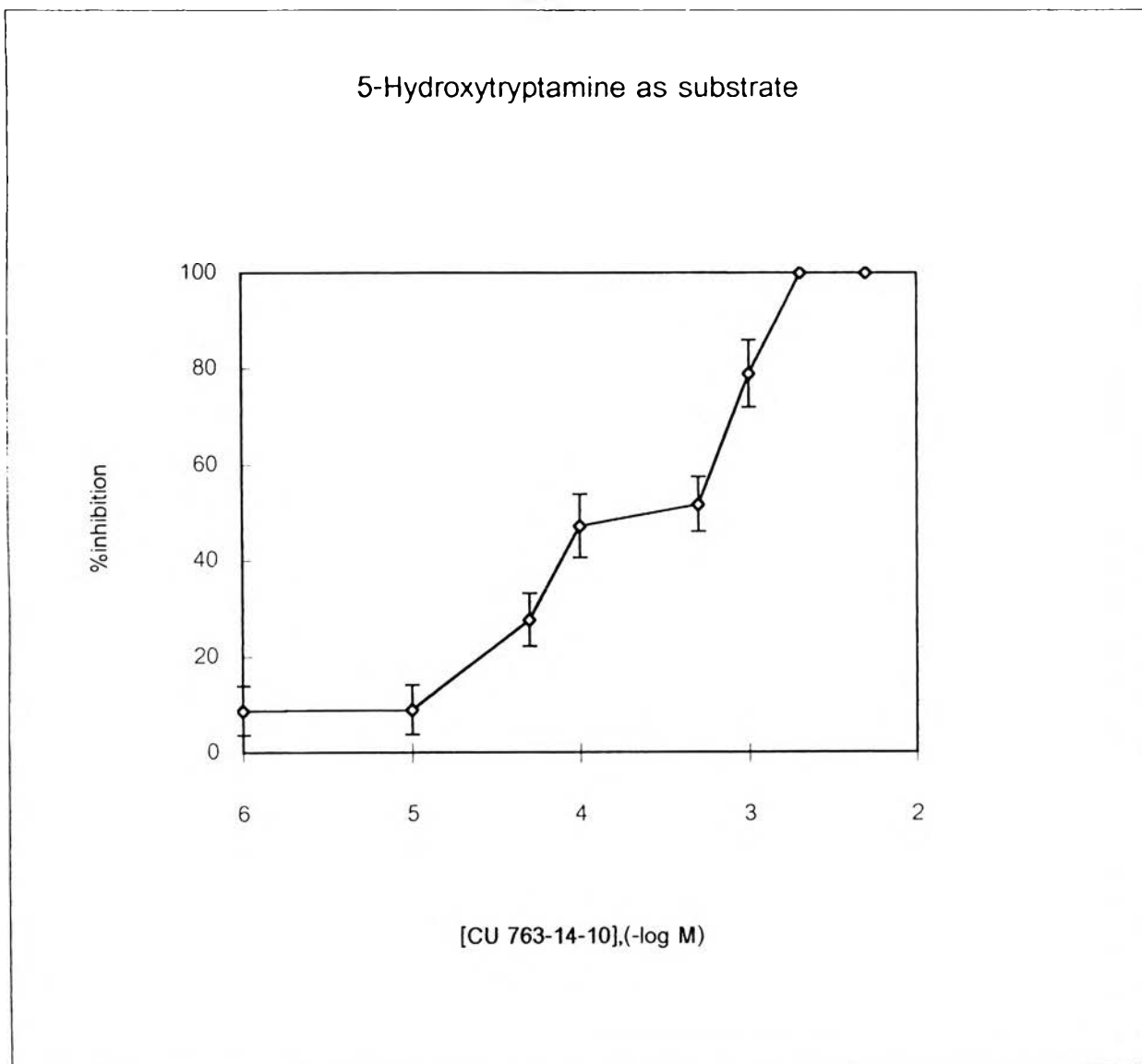
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.46 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-14-10 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 30 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 3.04 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-14-10 ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





รูปที่ 31 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

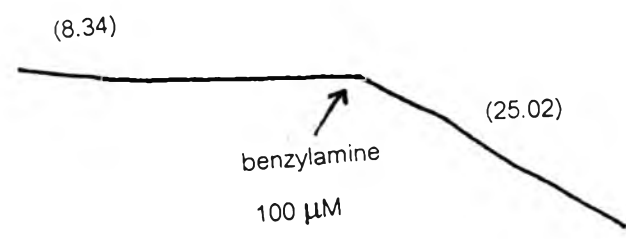
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , 5-hydroxytryptamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-14-10 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 32 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

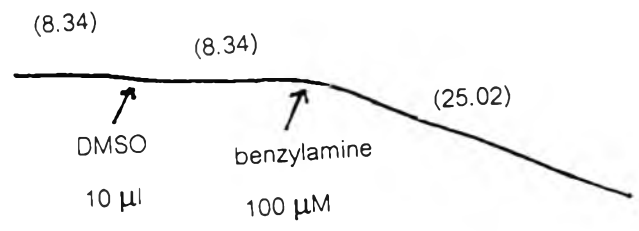
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 3.43 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-14-10 ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

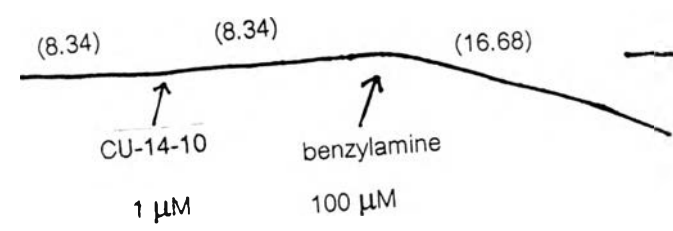
(A)



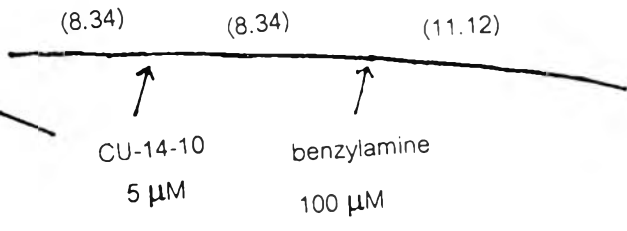
(B)



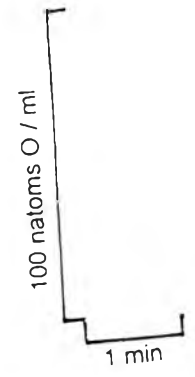
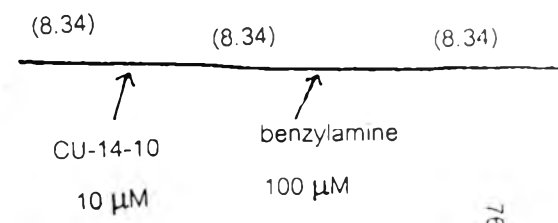
(C)

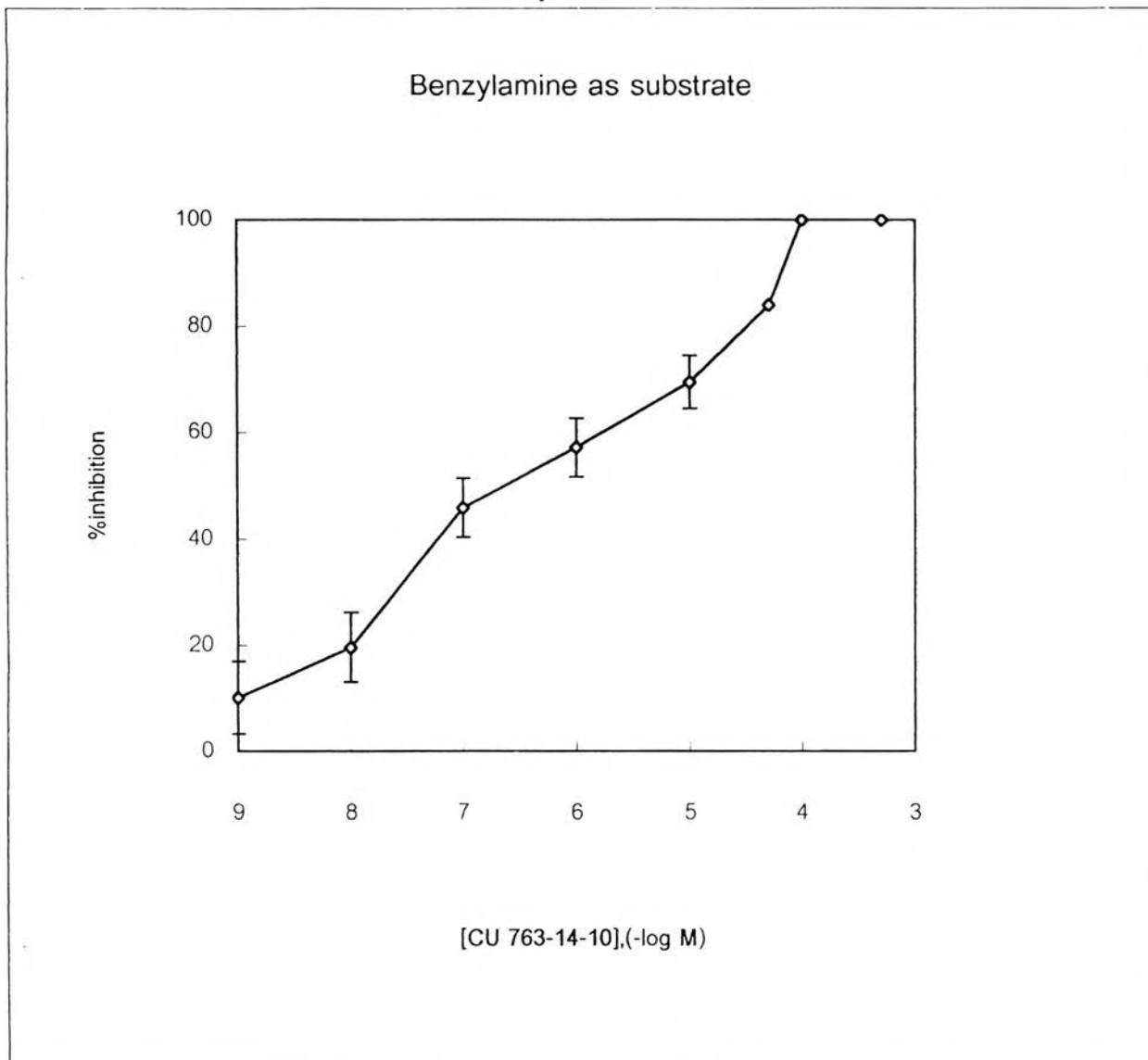


(D)



(E)





รูปที่ 33 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , benzylamine 100 μM และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.92 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-14-10 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตารางที่ 5

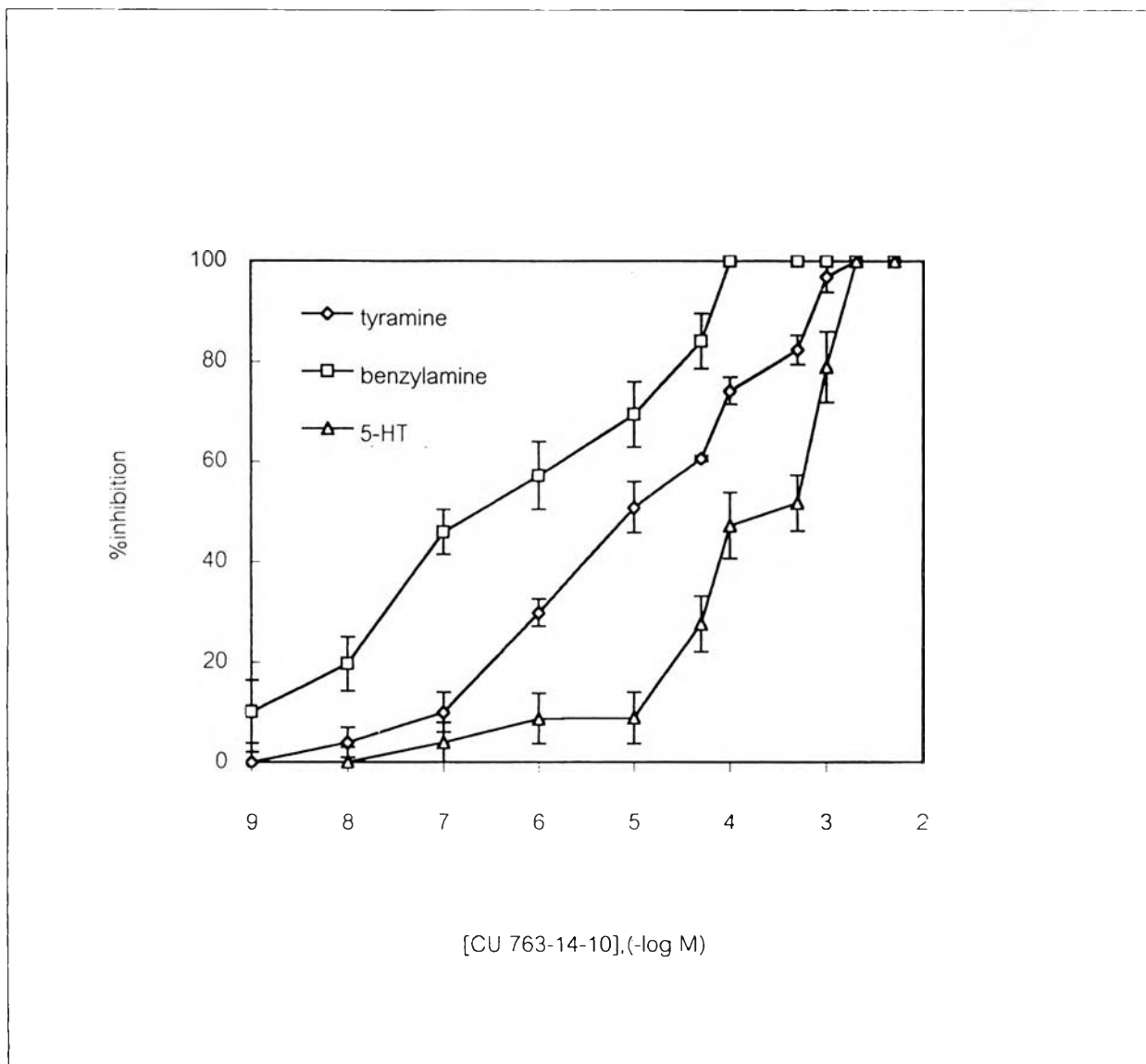
ผลของ CU 763-14-10 ต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

CU 763-14-10 (M)	MAO activities (natoms O / min / mg protein)		
	Tyramine (Both types)	5-Hydroxytryptamine (MAO-A)	Benzylamine (MAO-B)
Control	16.93 ± 2.41	7.61 ± 0.87	7.36 ± 2.31
DMSO (10µl)	16.93 ± 2.41	7.61 ± 0.87	7.36 ± 2.31
1x10 ⁻⁹	15.02 ± 0.37	-	7.32 ± 0.16
1x10 ⁻⁸	14.12 ± 0.74	-	6.42 ± 0.15
1x10 ⁻⁷	13.49 ± 0.63	-	5.45 ± 0.13
1x10 ⁻⁶	11.39 ± 1.43*	6.85 ± 0.51	2.70 ± 0.45
2x10 ⁻⁶	7.82 ± 0.93*	6.85 ± 0.51	2.04 ± 0.34
5x10 ⁻⁶	6.70 ± 0.66*	5.29 ± 1.08*	1.17 ± 0.66*
1x10 ⁻⁵	4.17 ± 0.58*	3.97 ± 0.87*	0.00 ± 0.00*
2x10 ⁻⁵	2.80 ± 0.48*	3.51 ± 0.48*	0.00 ± 0.00*
5x10 ⁻⁵	0.32 ± 0.32*	1.44 ± 0.60*	0.00 ± 0.00*
1x10 ⁻⁴	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
2x10 ⁻⁴	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 µg, ความเข้มข้นของสับสเตรท 100 µM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.46 (กรณีของ tyramine), 2.72 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 2.92 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-14-10 ที่ใช้ตั้งแต่ 1x10⁻⁶ - 2x10⁻⁴ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



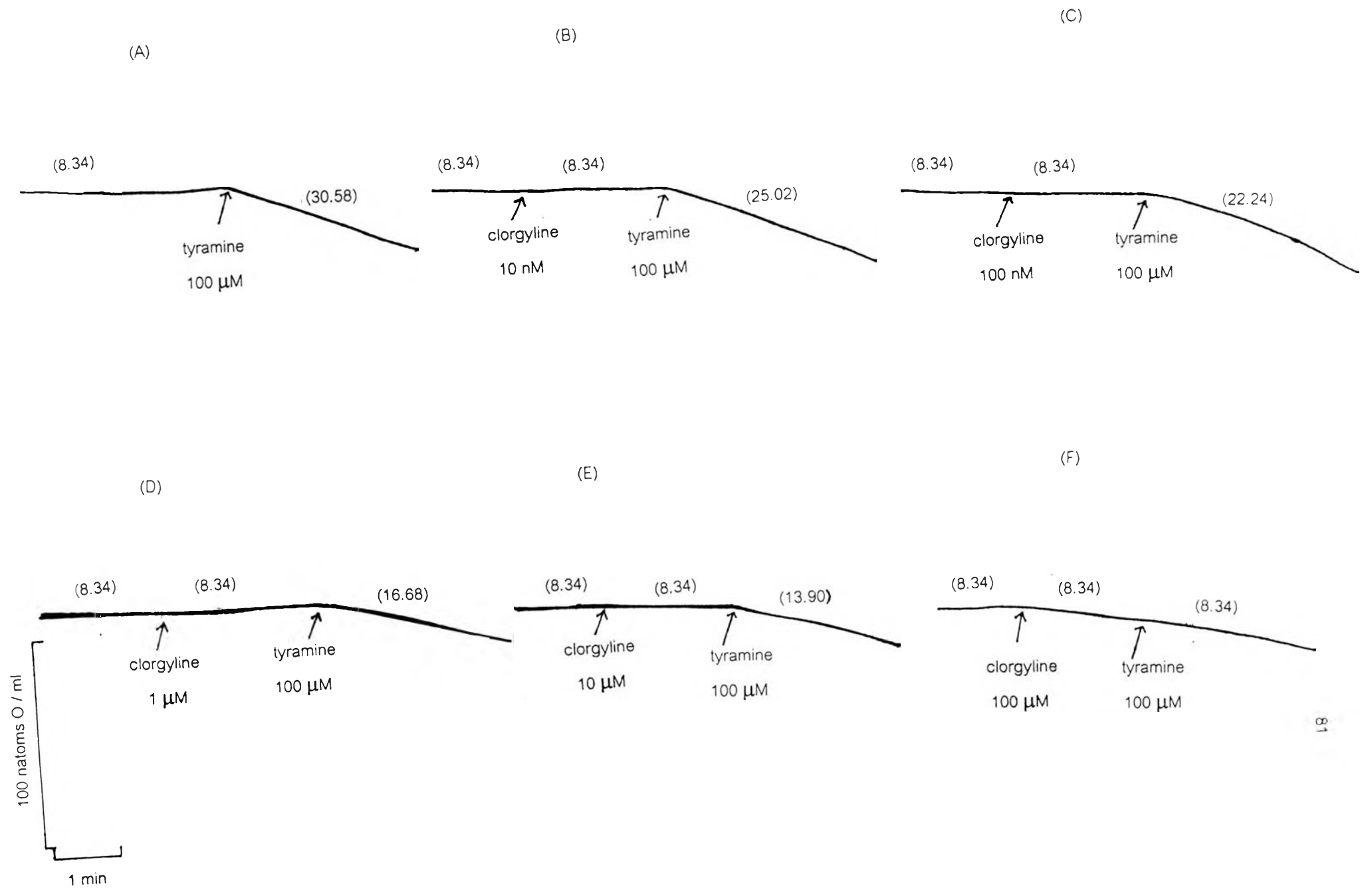
รูปที่ 34 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-14-10 เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

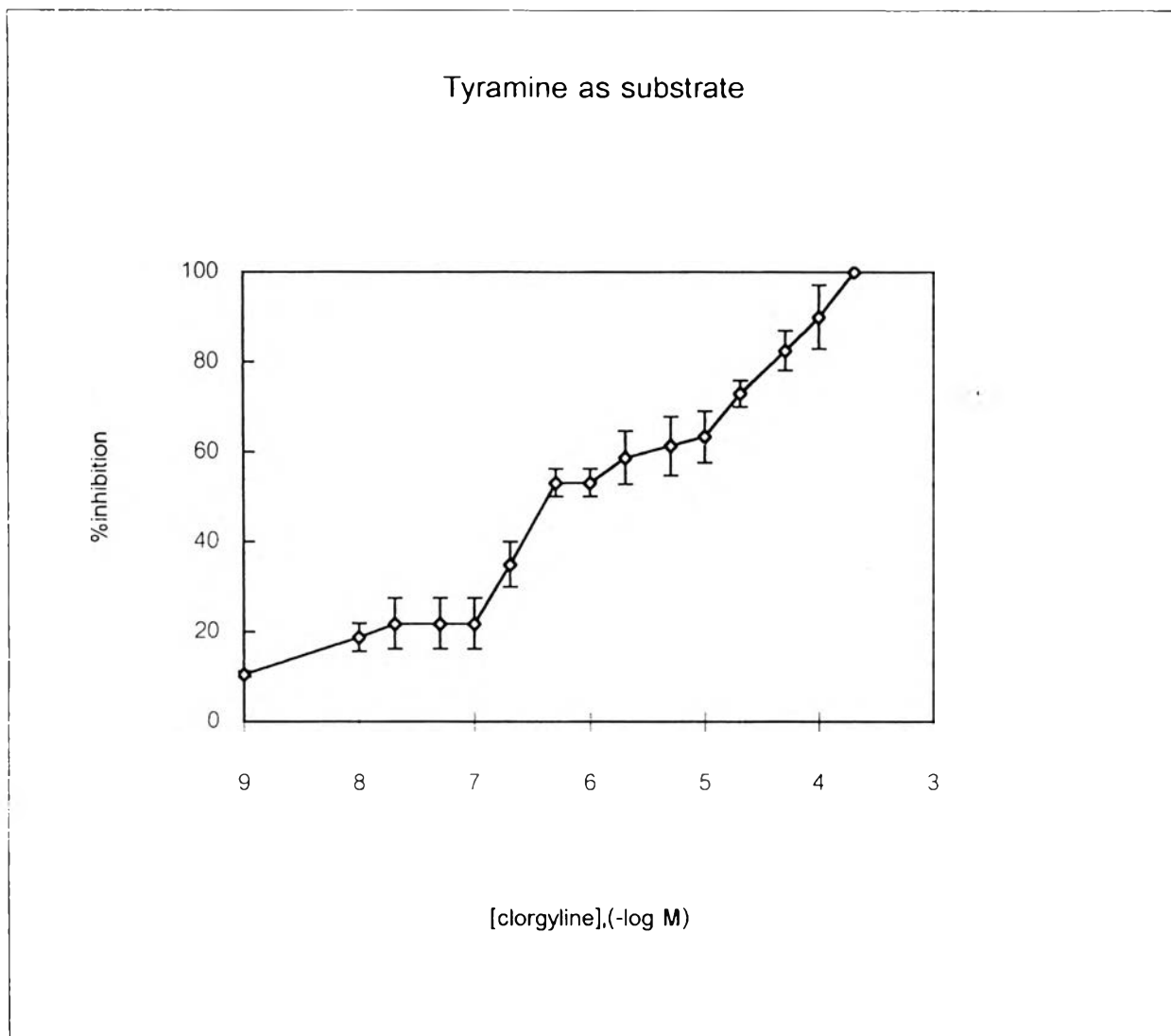
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, สับสเตรทที่ใช้ในแต่ละการทดลอง 100 μ M และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.46 (กรณีของ tyramine), 2.72 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 2.92 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ CU 763-14-10 ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-6} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 35 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย clorgyline (MAO-A inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 3.04 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ clorgyline และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





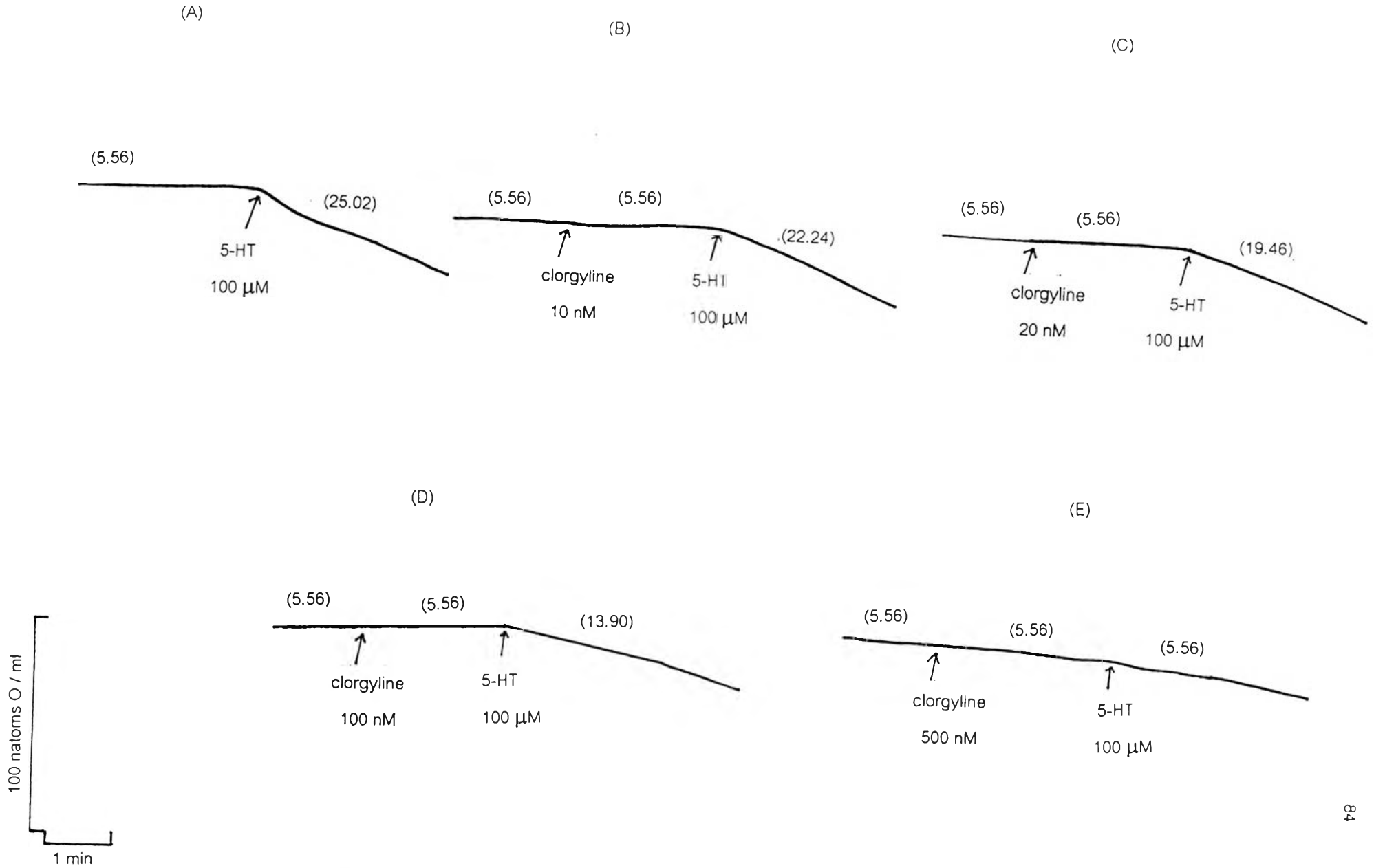
รูปที่ 36 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย clorgyline เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

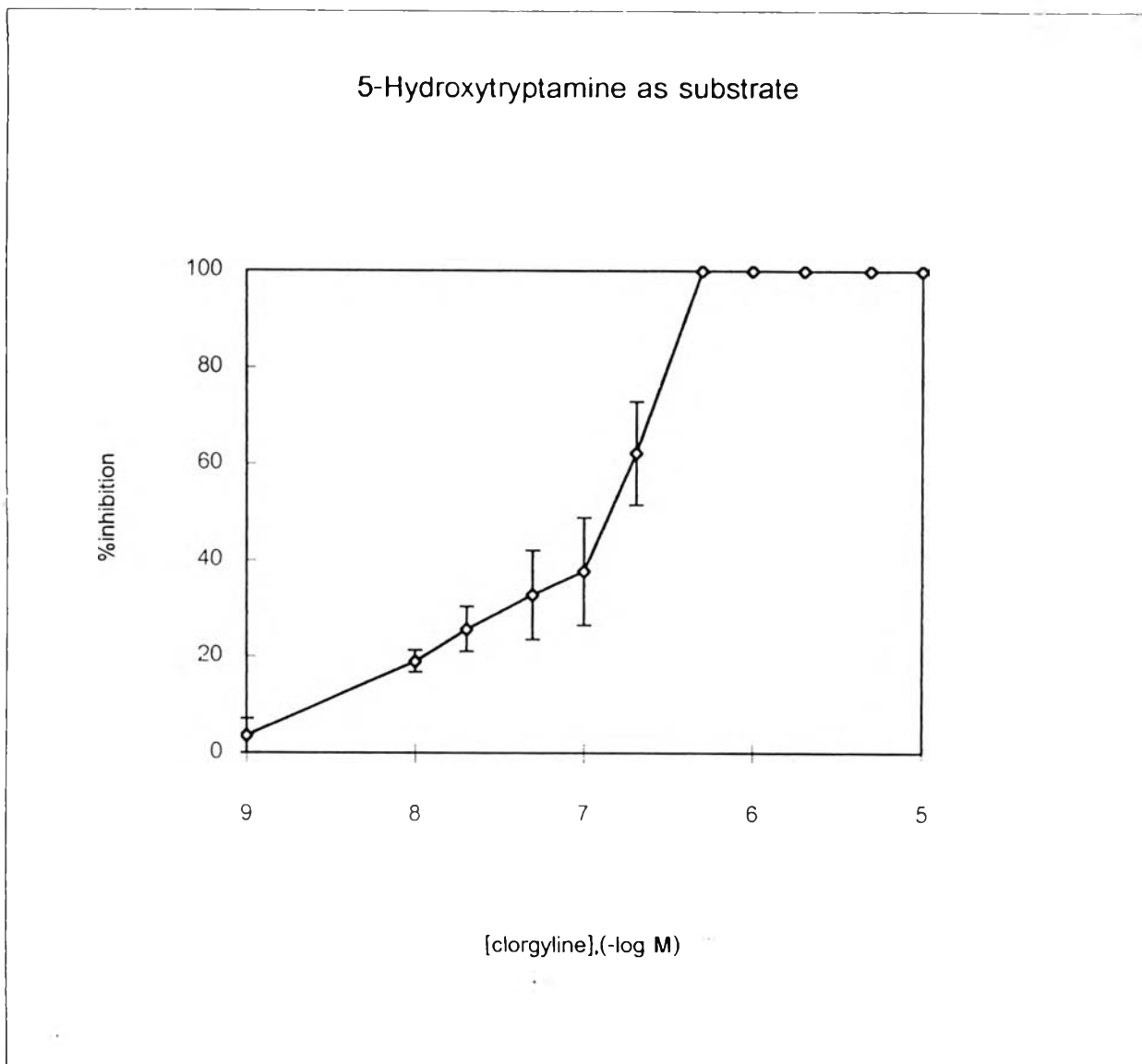
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.35 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ clorgyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 37 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจาก
ตับหนูขาว โดย clorgyline (MAO-A inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine
(preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate
dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone
10 μ g และไมโตคอนเดรีย 3.40 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ
clorgyline และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





รูปที่ 38 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย clorgyline เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

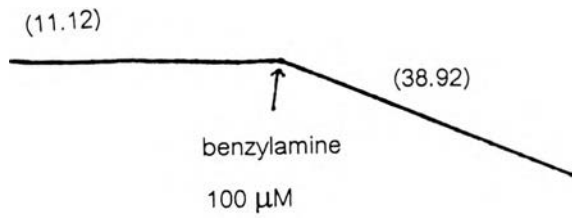
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , 5-hydroxytryptamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.56 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ clorgyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 39 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย clorgyline (MAO-A) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

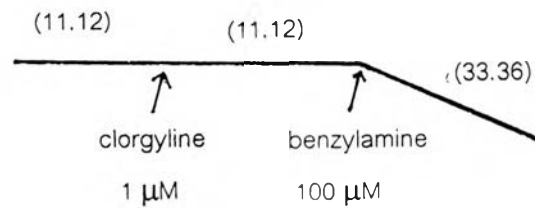
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 3.93 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ clorgyline และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

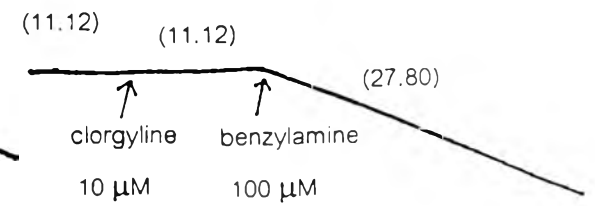
(A)



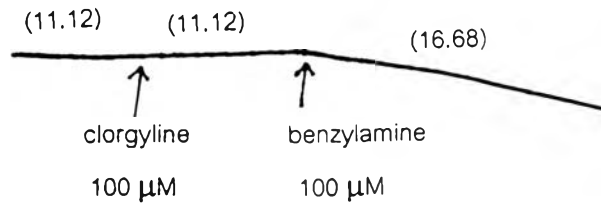
(B)



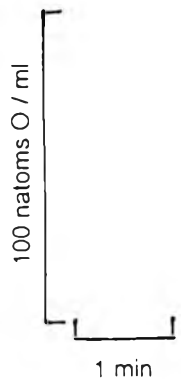
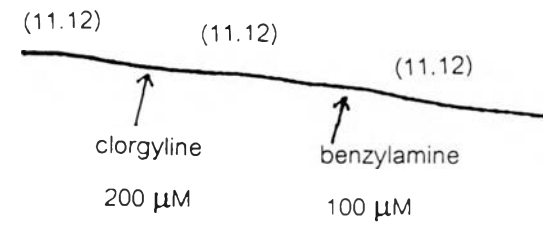
(C)

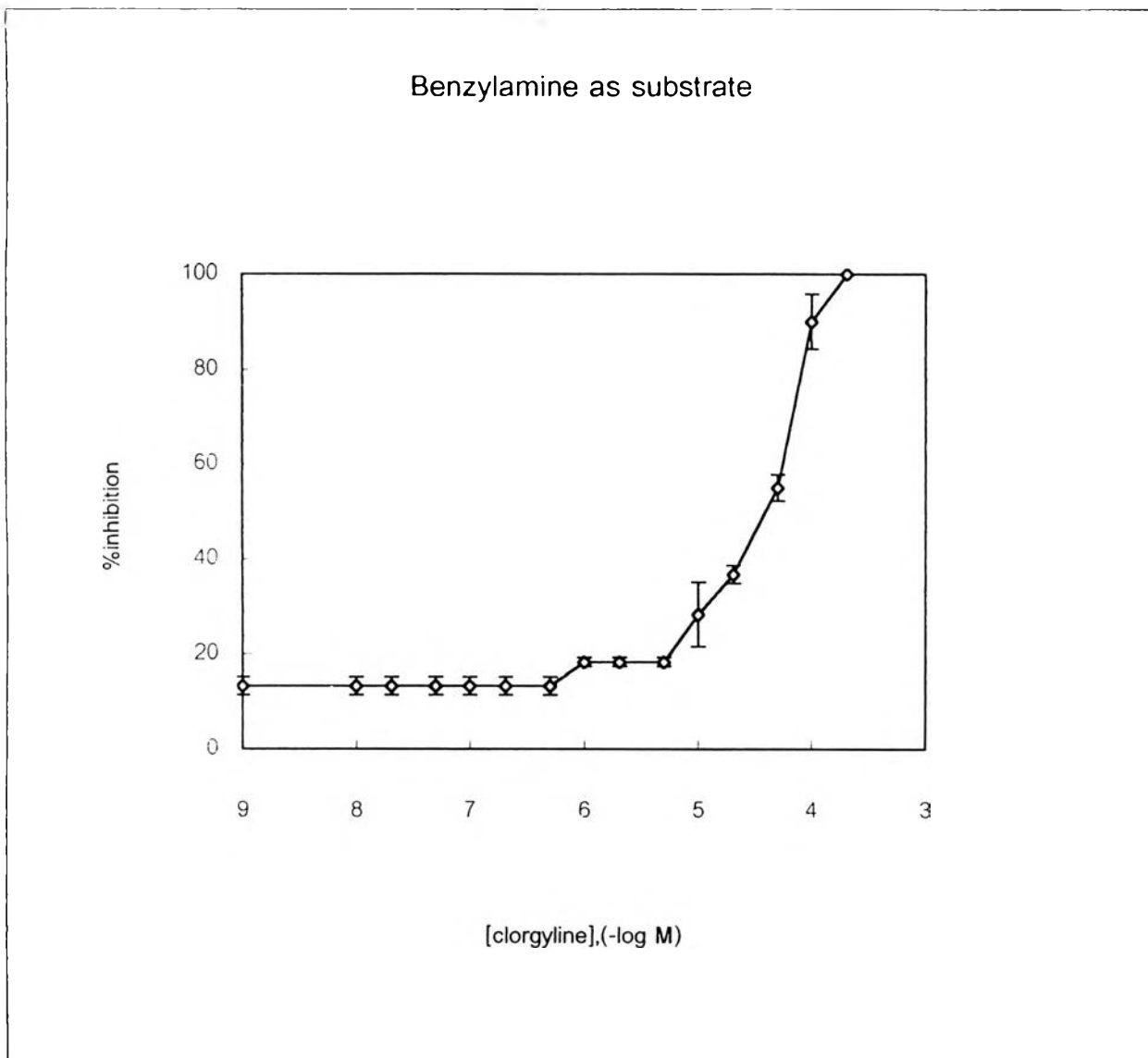


(D)



(E)





รูปที่ 40 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย clorgyline เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็น สับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , benzylamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.34 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ clorgyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตารางที่ 6

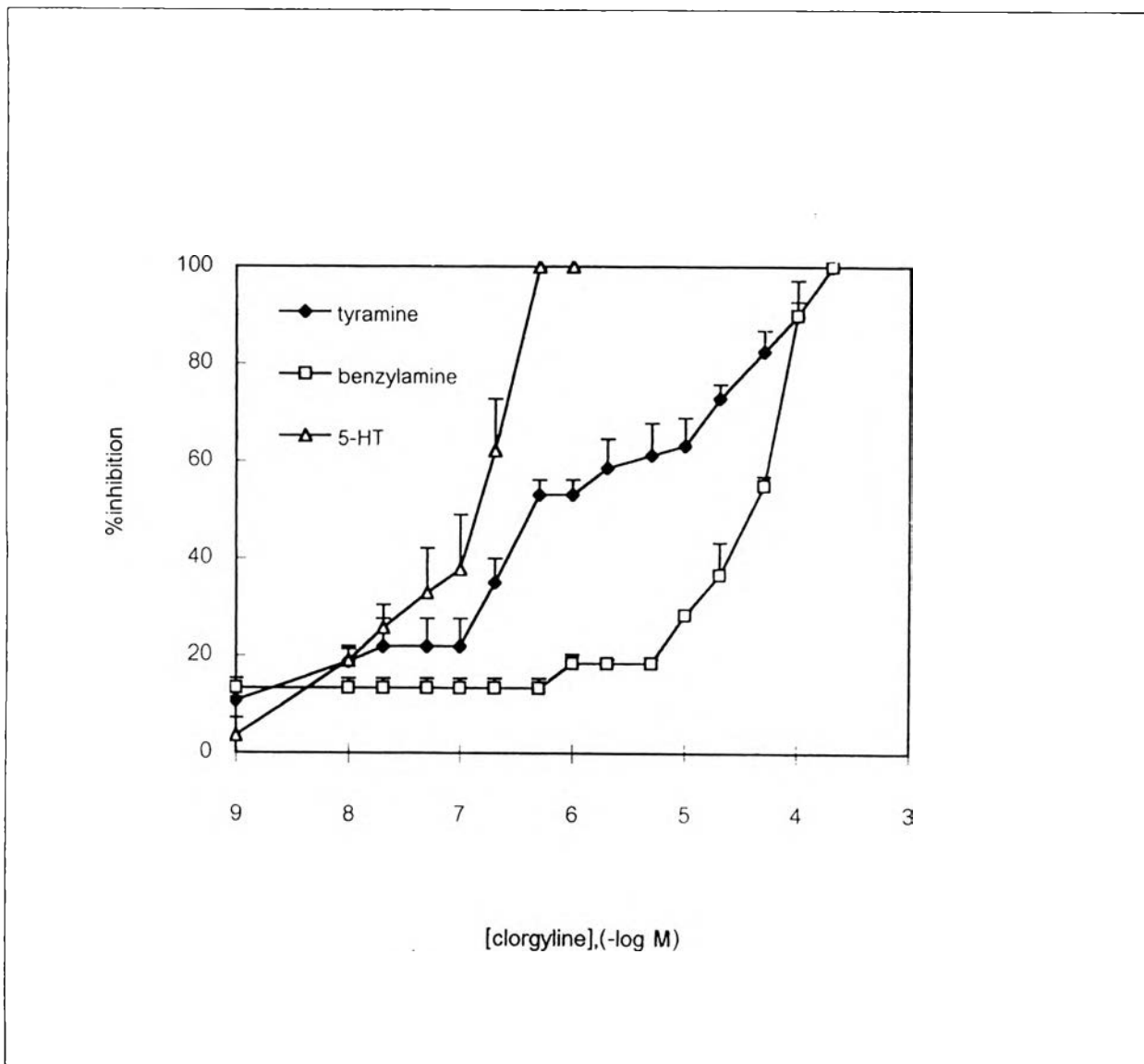
ผลของ clorgyline (MAO-A) ต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

Clorgyline (M)	MAO activities (natoms O / min / mg protein)		
	Tyramine (Both types)	5-Hydroxytryptamine (MAO-A)	Benzylamine (MAO-B)
Control	9.08 ± 2.13	5.08 ± 0.36	6.34 ± 0.73
1x10 ⁻⁹	7.87 ± 1.67	4.53 ± 0.16	5.52 ± 0.84
1x10 ⁻⁸	7.46 ± 1.80*	3.94 ± 0.33*	5.52 ± 0.84
2x10 ⁻⁸	7.23 ± 1.90*	3.56 ± 0.27*	5.52 ± 0.84
5x10 ⁻⁸	7.23 ± 1.90*	3.15 ± 0.30*	5.52 ± 0.84
1x10 ⁻⁷	7.23 ± 1.90*	2.97 ± 0.40*	5.52 ± 0.84
2x10 ⁻⁷	5.68 ± 1.55*	1.99 ± 0.31*	5.52 ± 0.84
5x10 ⁻⁷	4.31 ± 1.15*	0.00 ± 0.00*	5.52 ± 0.84
1x10 ⁻⁶	4.31 ± 1.15*	0.00 ± 0.00*	5.16 ± 0.49
2x10 ⁻⁶	3.92 ± 1.31*	0.00 ± 0.00*	5.16 ± 0.49
5x10 ⁻⁶	3.75 ± 1.37*	0.00 ± 0.00*	5.16 ± 0.49
1x10 ⁻⁵	3.43 ± 1.07*	0.00 ± 0.00*	4.46 ± 0.21
2x10 ⁻⁵	2.59 ± 0.86*	0.00 ± 0.00*	3.99 ± 0.25
5x10 ⁻⁵	1.56 ± 0.46*	0.00 ± 0.00*	2.81 ± 0.10
1x10 ⁻⁴	0.85 ± 0.52*	0.00 ± 0.00*	2.11 ± 0.69
2x10 ⁻⁴	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 µg, ความเข้มข้นของสับสเตรท 100 µM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.35 (กรณีของ tyramine), 3.56 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 3.34 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ clorgyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1x10⁻⁹ - 2x10⁻⁴ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



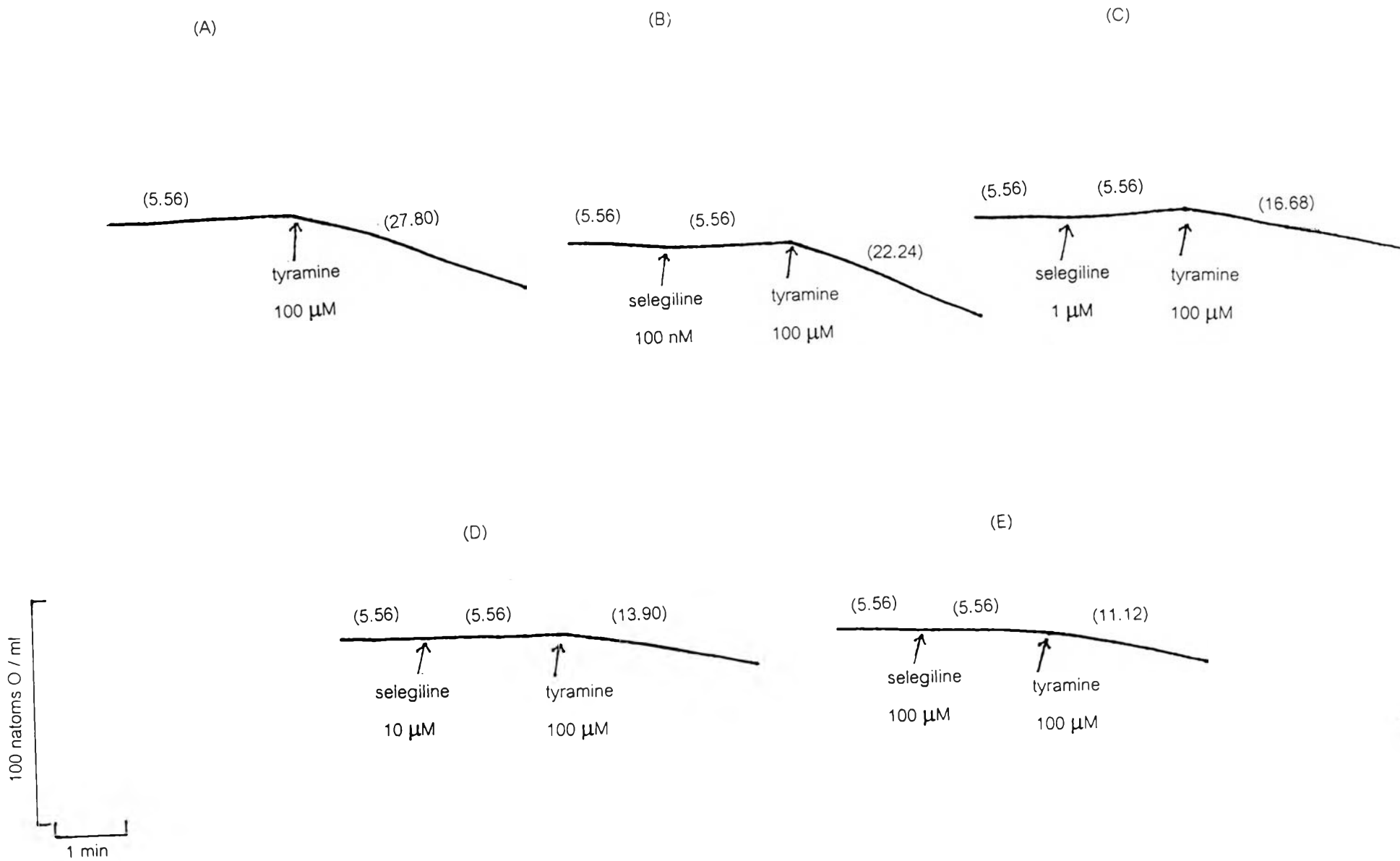
รูปที่ 41 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย clorgyline เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

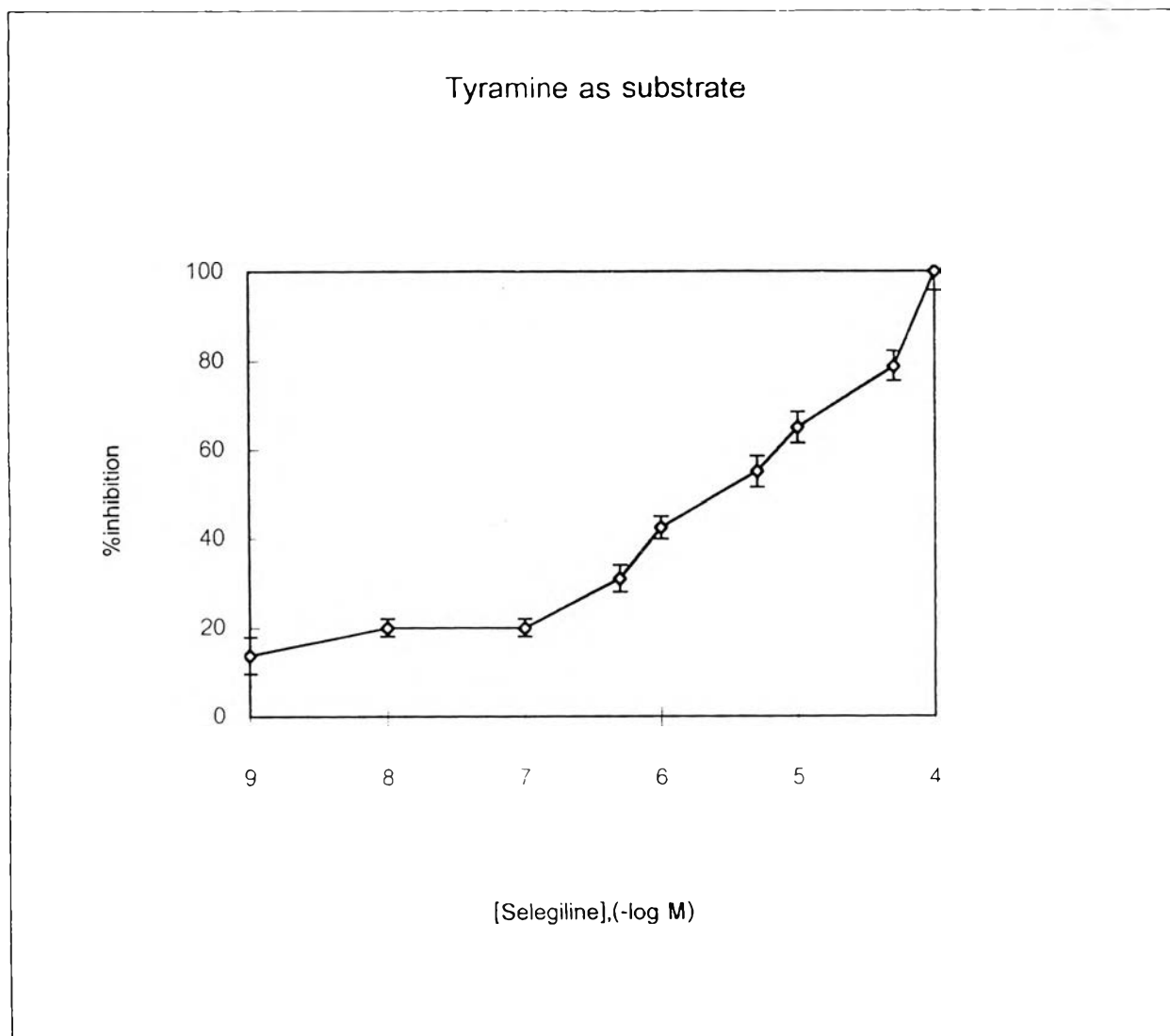
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, สับสเตรทที่ใช้ในแต่ละการทดลอง 100 μ M และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.35 (กรณีของ tyramine), 3.56 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 3.34 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ clorgylineที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 2×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 42 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย selegiline (MAO-B inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 4.29 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ selegiline และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





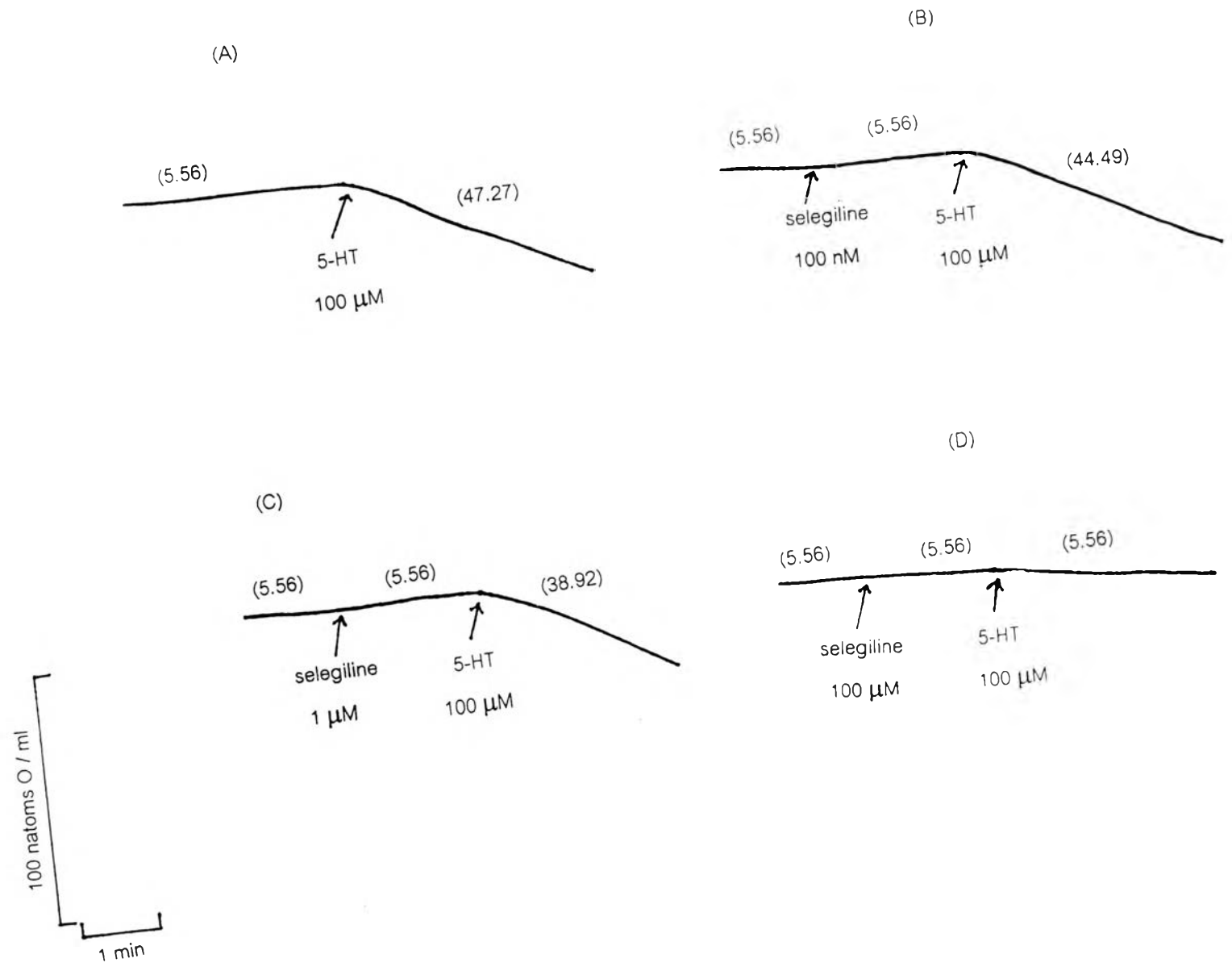
รูปที่ 43 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย selegiline เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

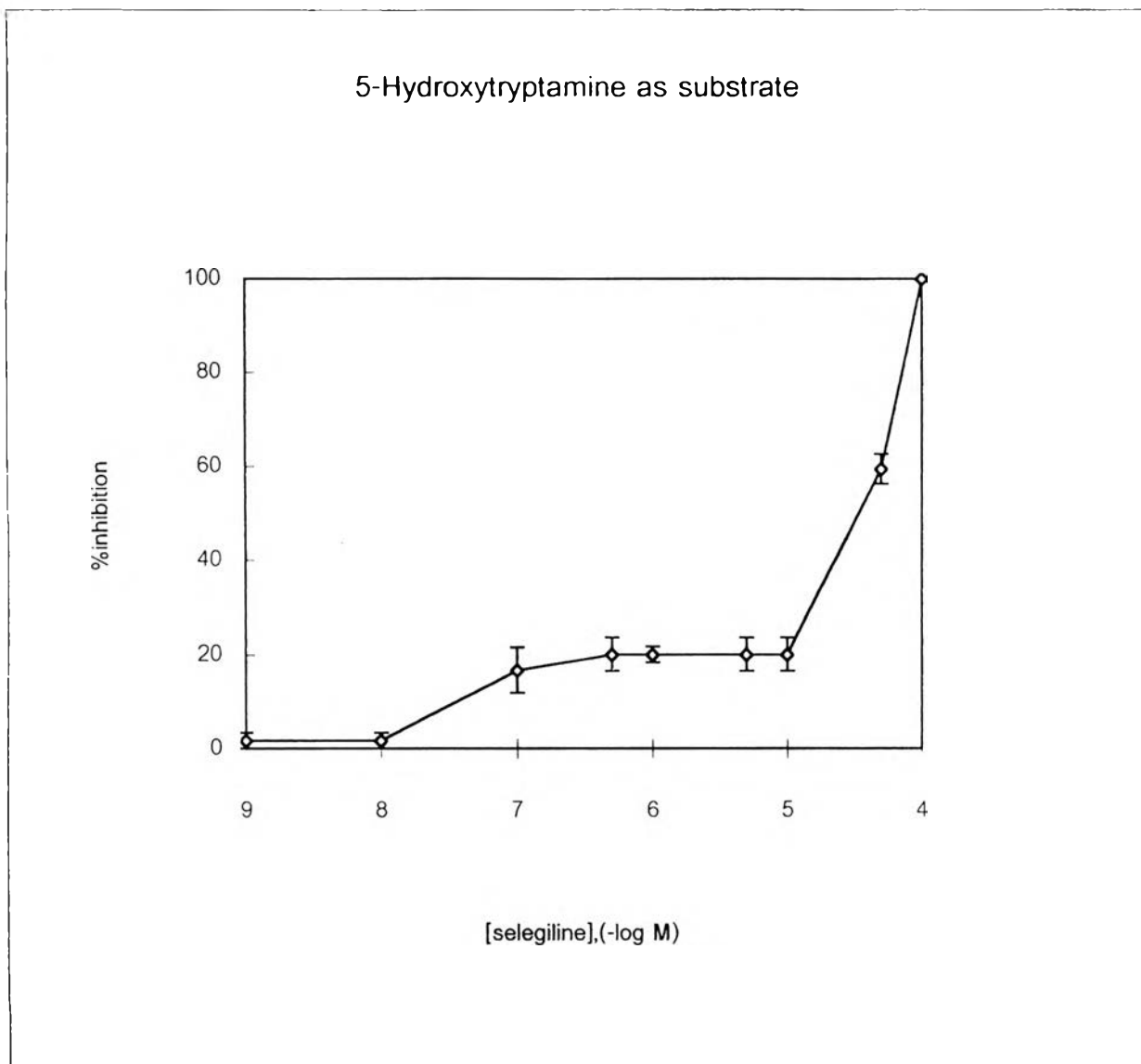
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.30 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ selegiline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 44 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย selegiline (MAO-B inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 1.59 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ selegiline และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





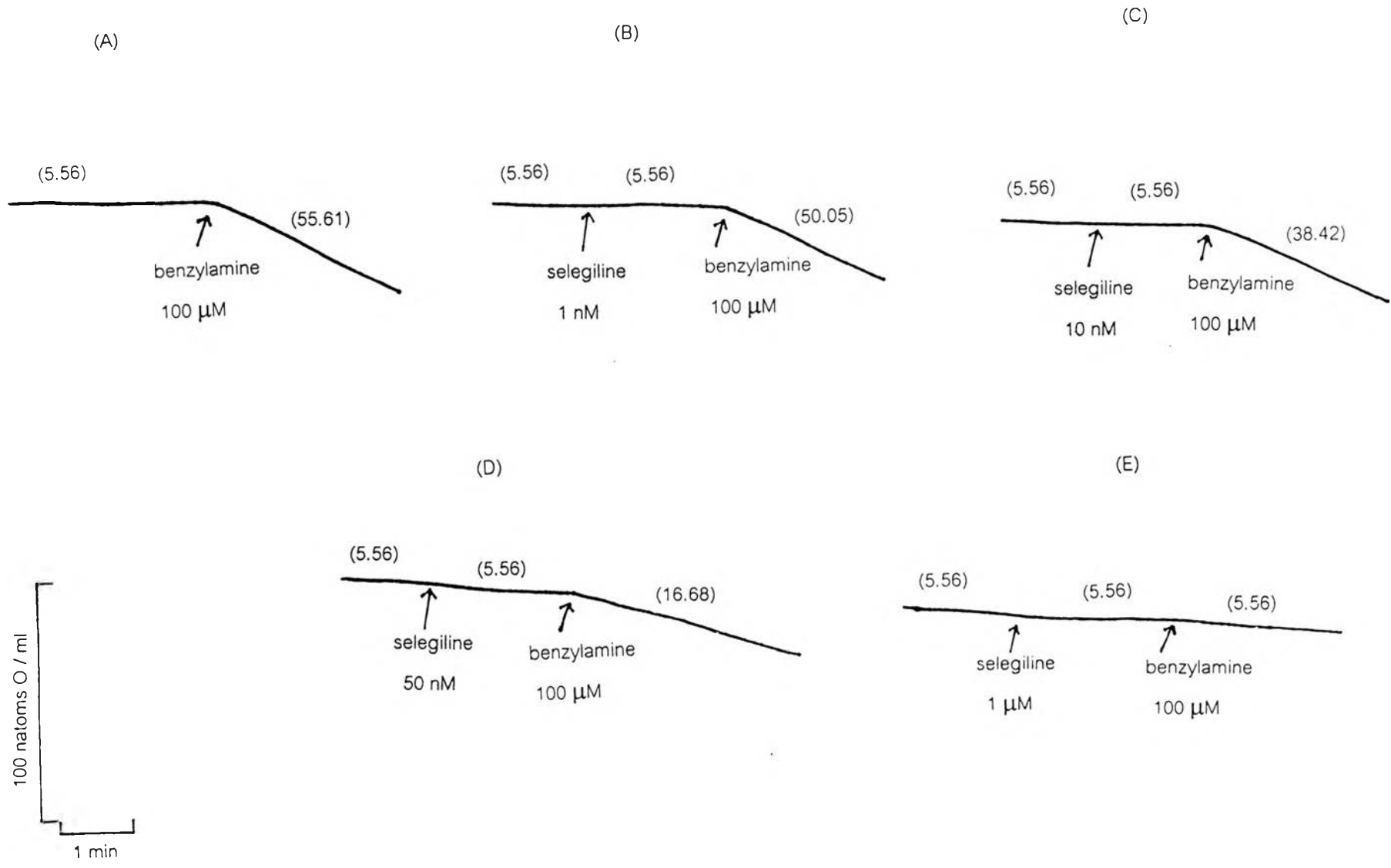
รูปที่ 45 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย selegiline เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

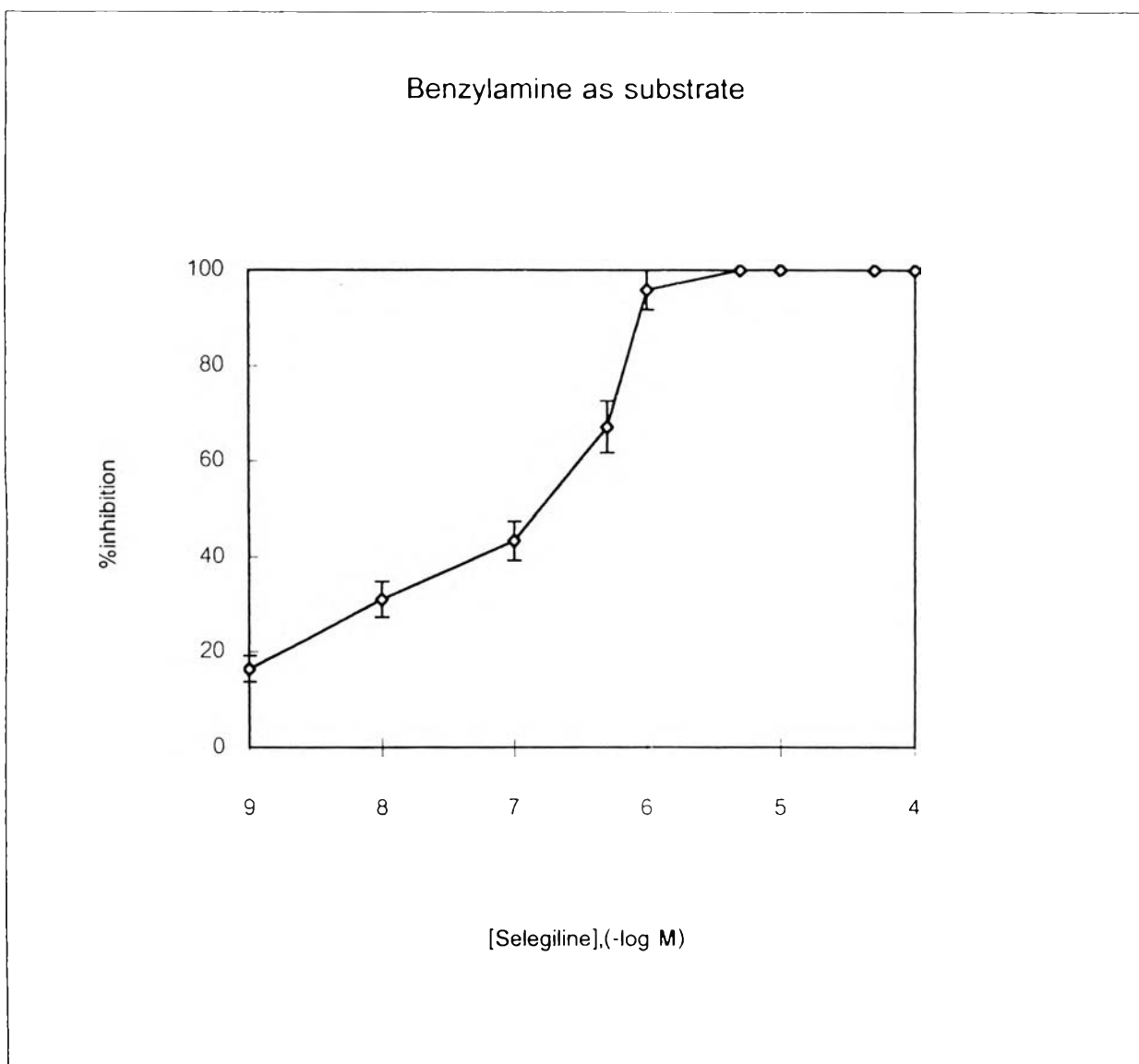
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , 5-hydroxytryptamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.27 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ selegiline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 46 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย selegiline (MAO-B inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 1.59 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ selegiline และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล. นาที





รูปที่ 47 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย selegiline เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็น สับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , benzylamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.30 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ selegiline ที่ ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตารางที่ 7

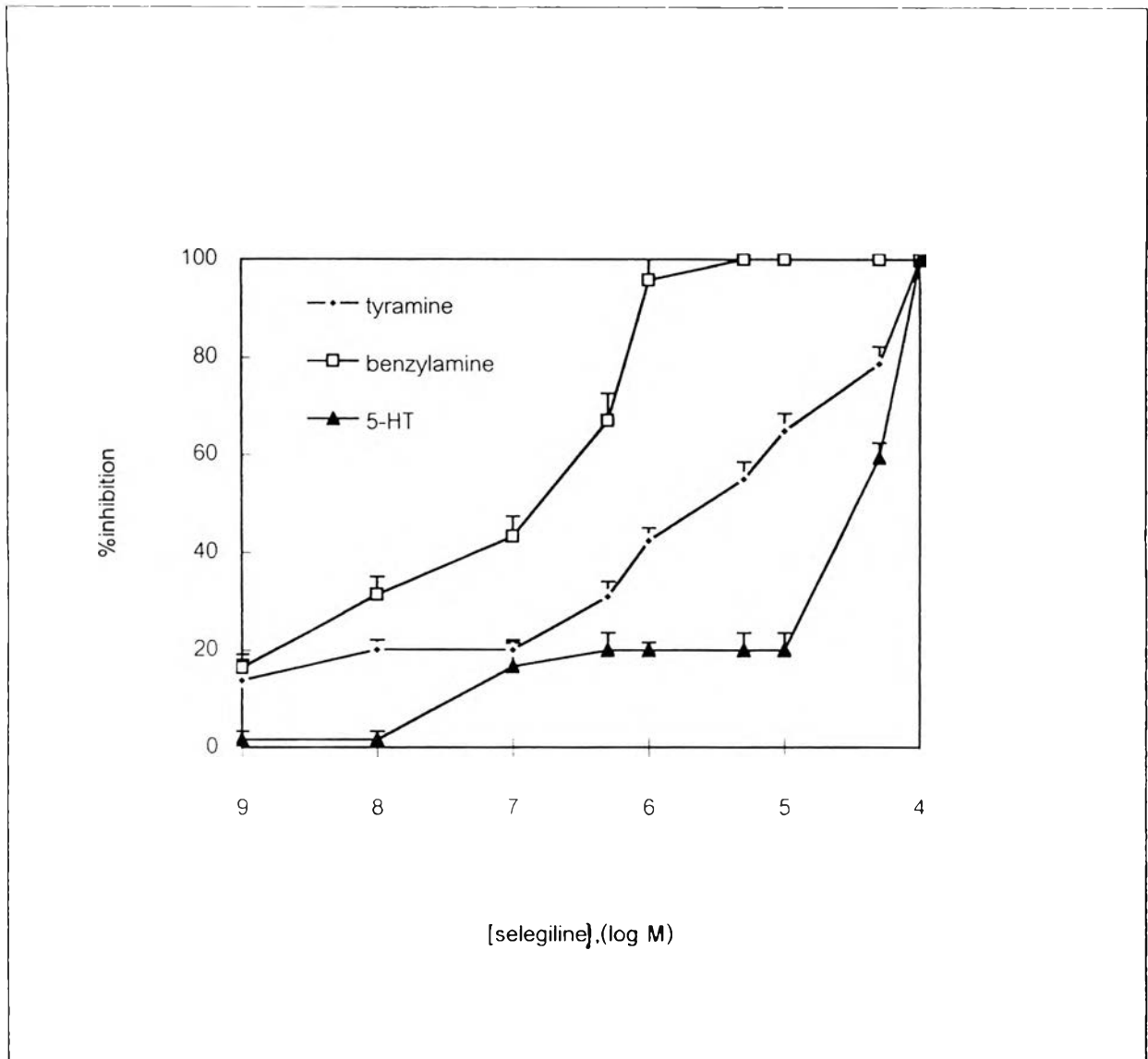
ผลของ selegiline (MAO-B inhibitor) ต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

Selegiline (M)	MAO activities (natoms O / min / mg protein)		
	Tyramine (Both types)	5-Hydroxytryptamine (MAO-A)	Benzylamine (MAO-B)
Control	12.12 ± 4.96	16.88 ± 5.39	18.98 ± 4.56
1x10 ⁻⁹	10.79 ± 4.76*	16.45 ± 5.15	15.97 ± 4.20*
1x10 ⁻⁸	9.87 ± 3.96*	16.45 ± 5.15	13.15 ± 3.13*
1x10 ⁻⁷	9.87 ± 3.96*	15.07 ± 5.43*	11.25 ± 3.47*
5x10 ⁻⁷	8.65 ± 3.69*	14.19 ± 4.98*	6.01 ± 1.20*
1x10 ⁻⁶	7.22 ± 3.02*	14.19 ± 4.98*	0.69 ± 0.69*
5x10 ⁻⁶	5.63 ± 2.44*	14.19 ± 4.98*	0.00 ± 0.00*
1x10 ⁻⁵	5.63 ± 2.44*	14.19 ± 4.98*	0.00 ± 0.00*
5x10 ⁻⁵	4.58 ± 2.09*	7.10 ± 2.49*	0.00 ± 0.00*
1x10 ⁻⁴	2.92 ± 1.42*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 µg, ความเข้มข้นของสับสเตรท 100 µM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.30 (กรณีของ tyramine), 2.27 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 2.30 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ selegiline ที่ใช้ตั้งแต่ 1x10⁻⁹ - 1x10⁻⁴ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



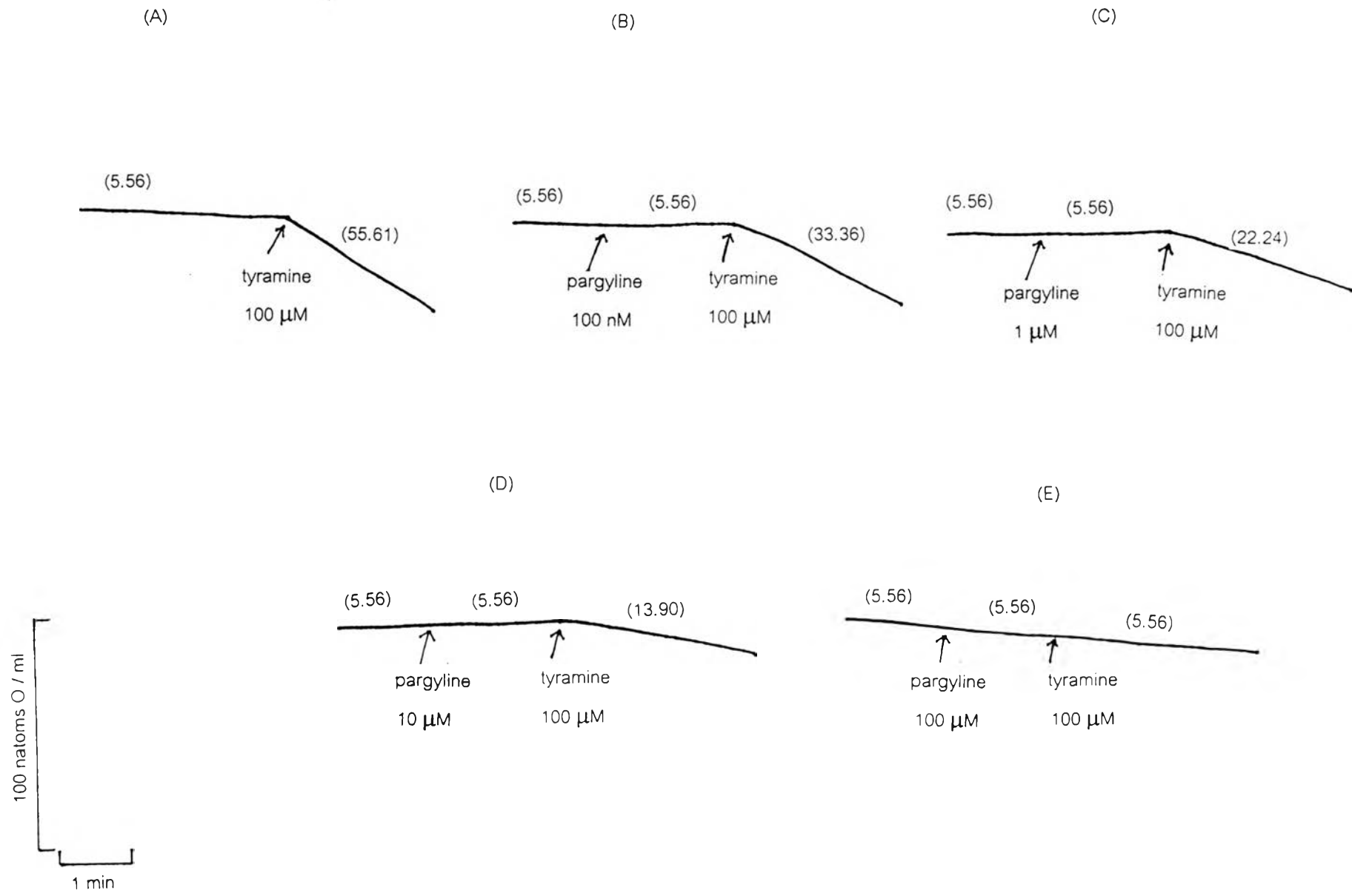
รูปที่ 48 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย selegiline เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

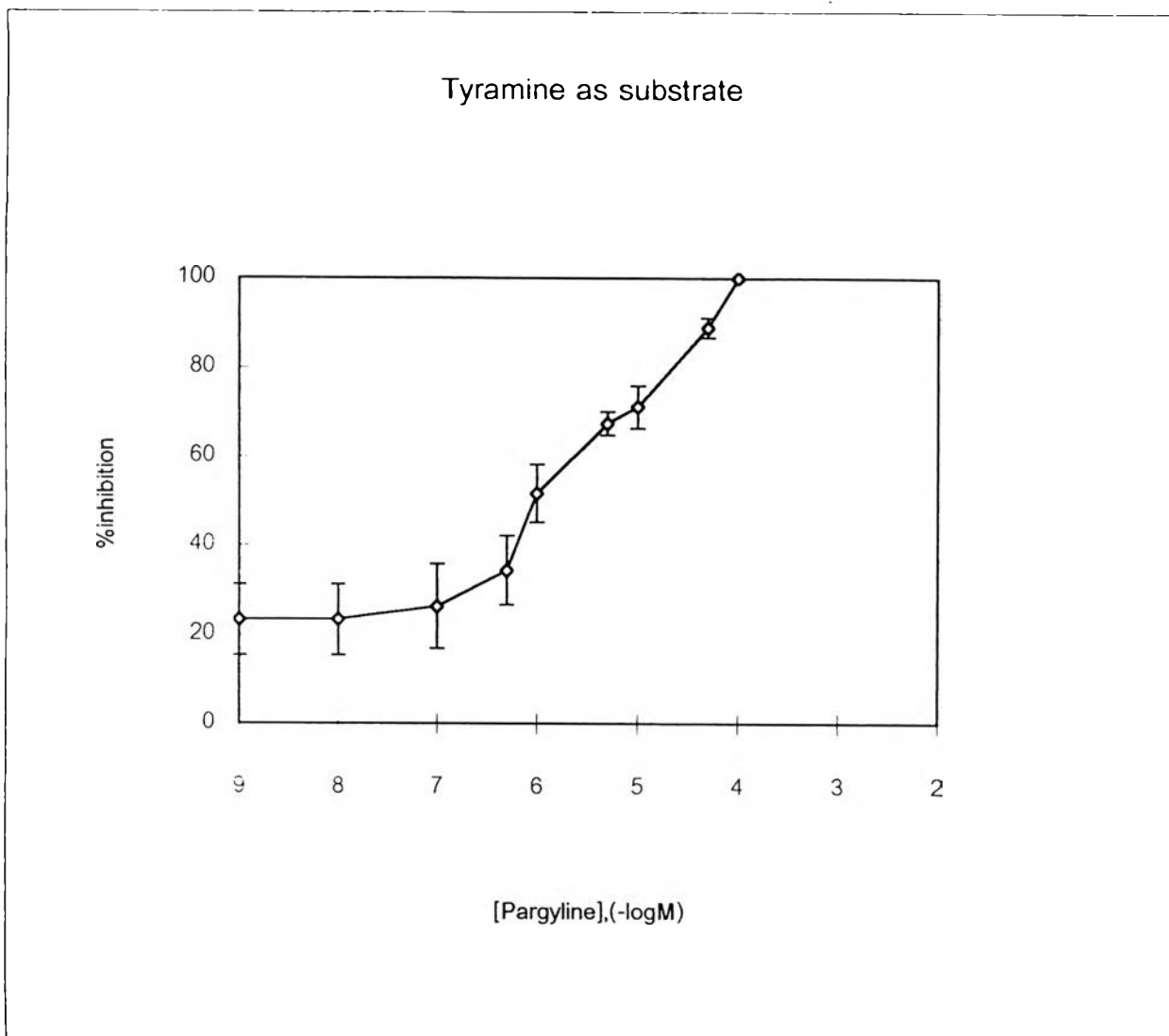
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, สับสเตรทที่ใช้ในแต่ละการทดลอง 100 μ M และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.30 (กรณีของ tyramine), 2.27 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 2.30 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ selegiline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 49 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย pargyline (nonspecific inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ tyramine (nonspecific) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.53 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ pargyline และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





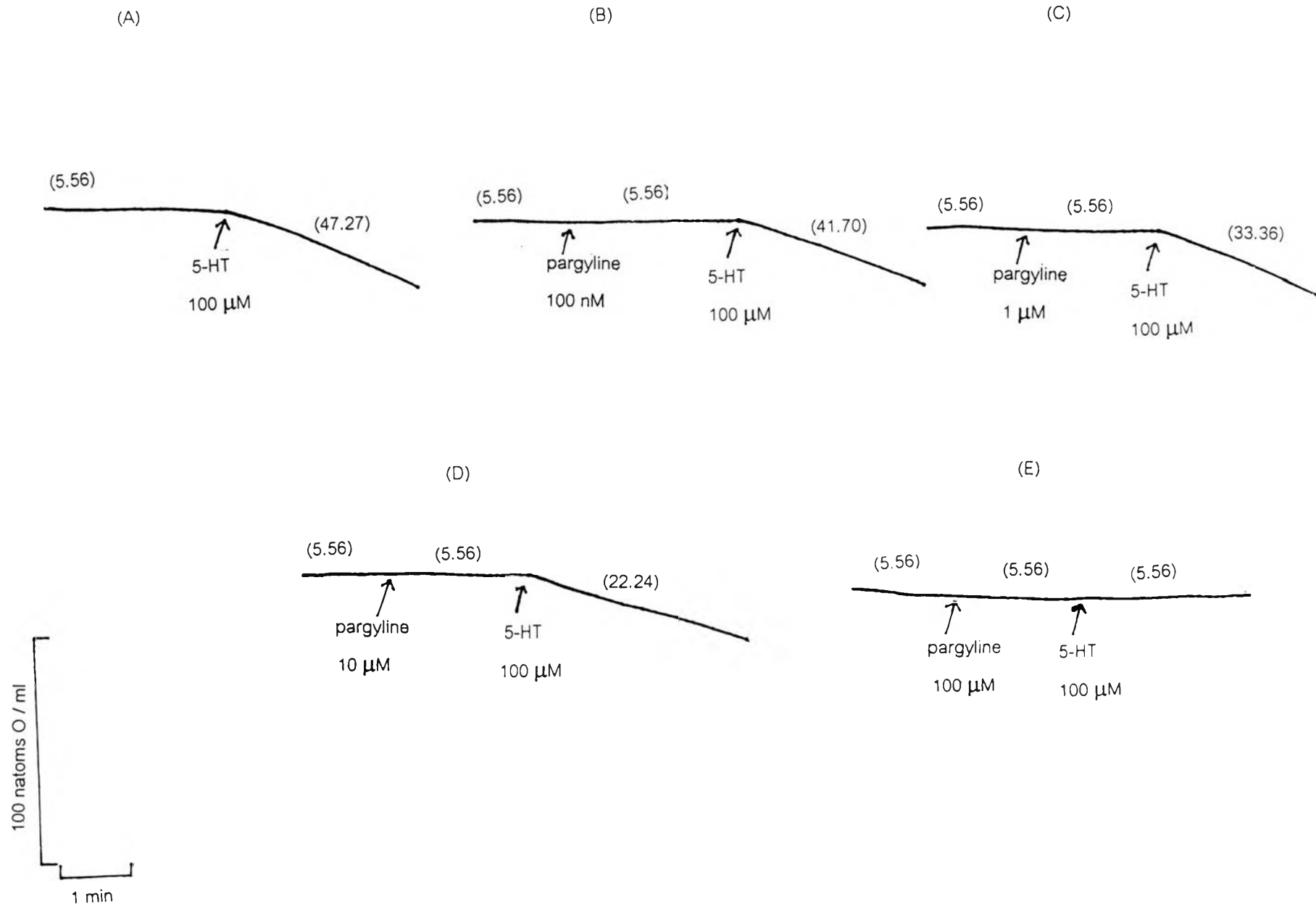
รูปที่ 50 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย pargyline เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

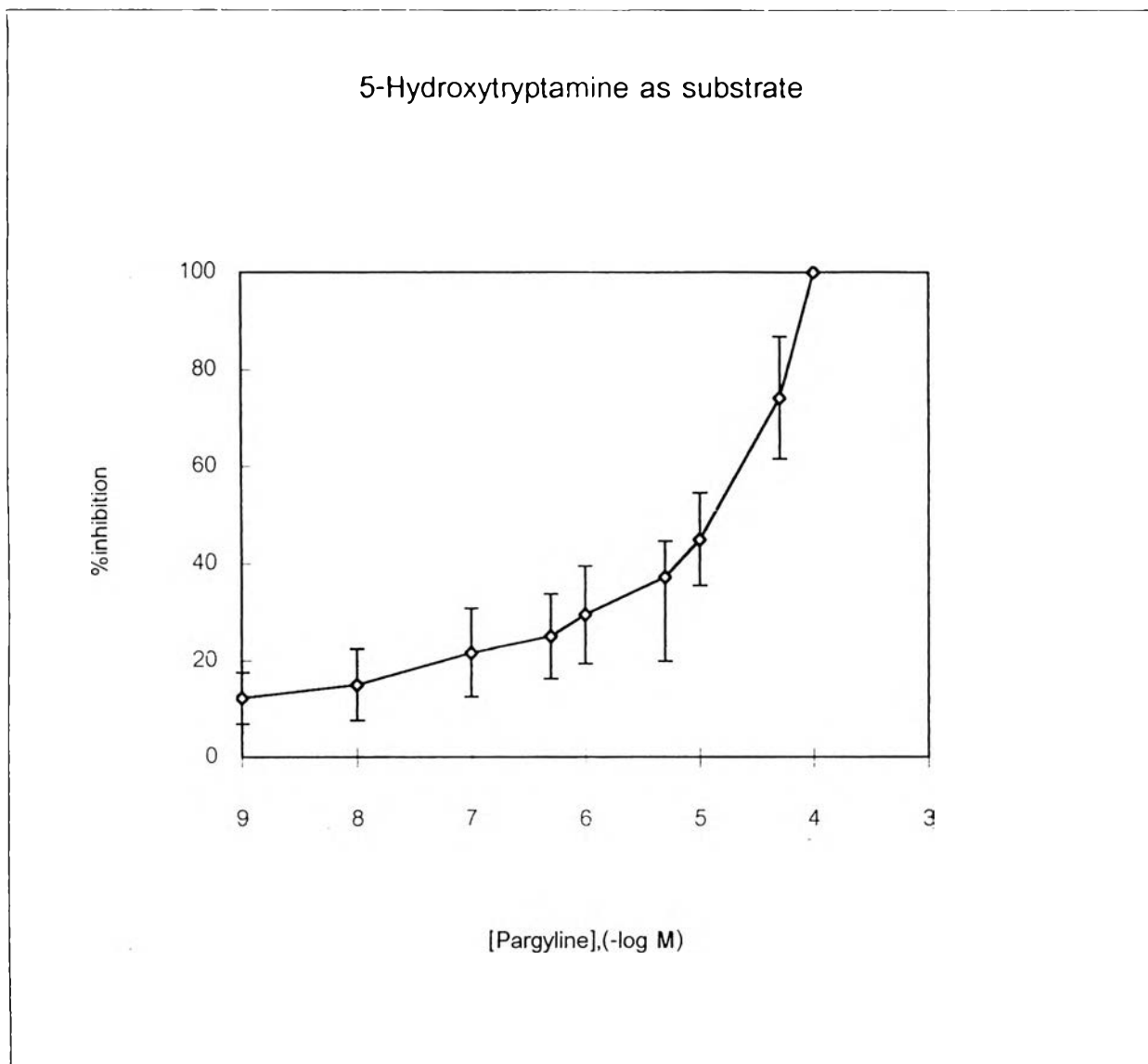
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.64 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ pargyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 51 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย pargyline (nonspecific inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 3.01 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ pargyline และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล. นาที





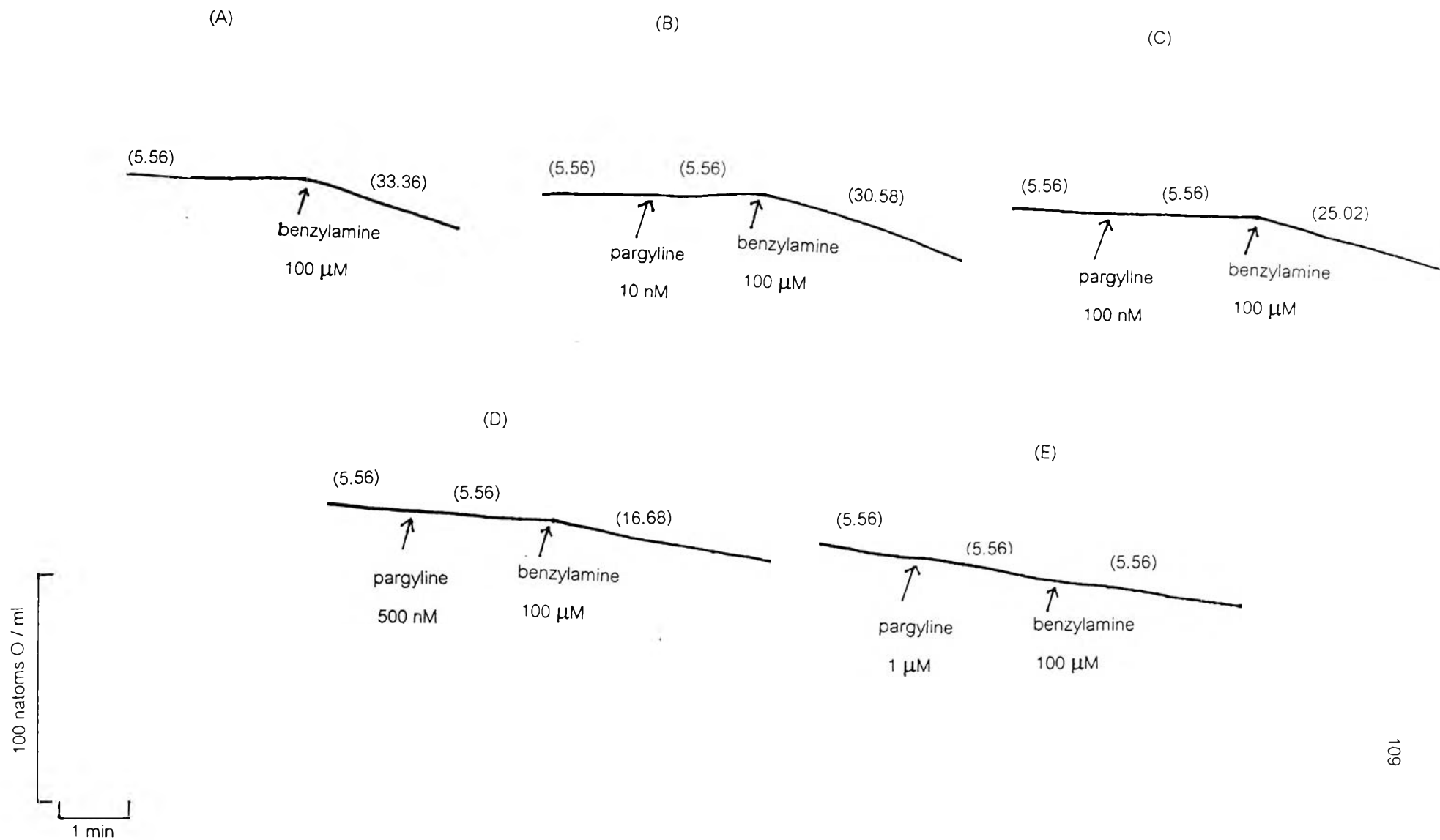
รูปที่ 52 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย pargyline เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

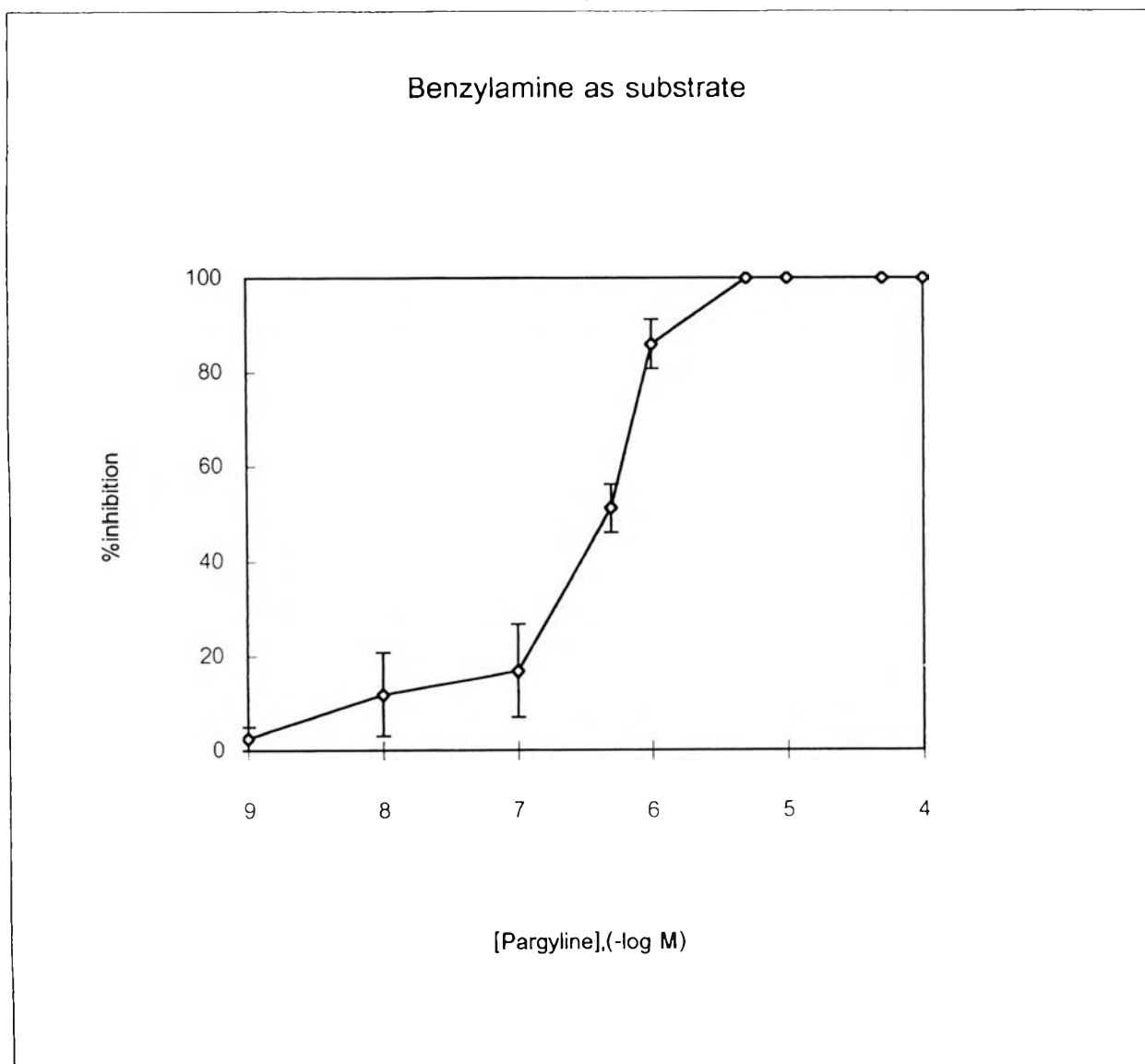
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , 5-hydroxytryptamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.87 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ pargyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

รูปที่ 53 Oxygraph tracings แสดงการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย pargyline (nonspecific inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g และไมโตคอนเดรีย 3.01 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ pargyline และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที





รูปที่ 54 ผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย pargyline เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็น สับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , benzylamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.04 มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ pargyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตารางที่ 8

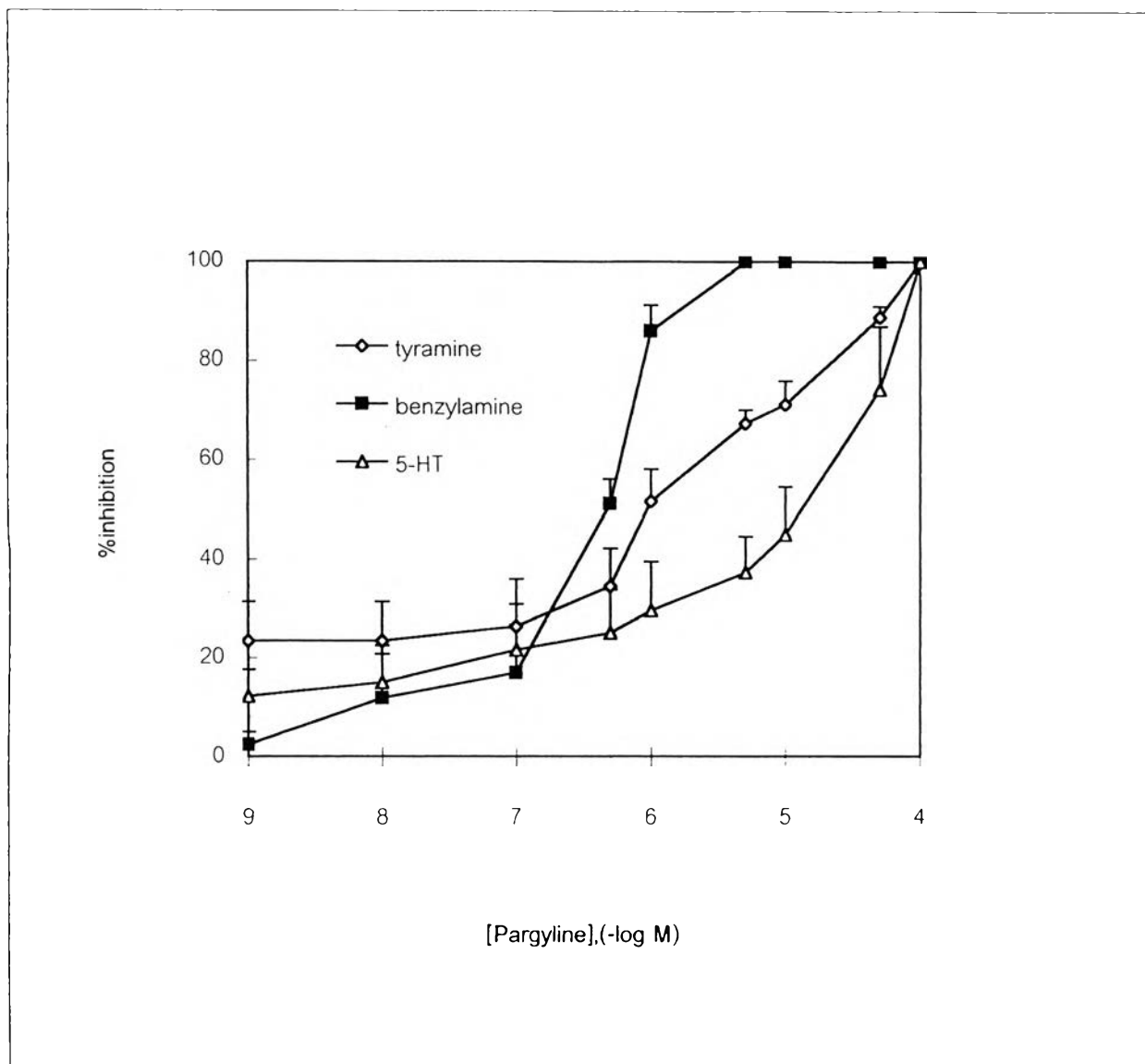
ผลของ pargyline (nonspecific inhibitor) ต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวเมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท

Pargyline (M)	MAO activities (natoms O / min / mg protein)		
	Tyramine (Both types)	5-Hydroxytryptamine (MAO-A)	Benzylamine (MAO-B)
Control	19.52 ± 0.26	10.55 ± 1.27	10.10 ± 1.02
1x10 ⁻⁹	14.90 ± 1.31	9.23 ± 1.24	9.87 ± 1.12
1x10 ⁻⁸	14.90 ± 1.31	8.94 ± 1.36	8.72 ± 0.85
1x10 ⁻⁷	14.32 ± 1.64	8.19 ± 1.31	8.26 ± 1.03
5x10 ⁻⁷	12.76 ± 1.41*	7.73 ± 0.86	5.07 ± 1.00*
1x10 ⁻⁶	9.39 ± 1.14*	7.21 ± 0.79	1.51 ± 0.65*
5x10 ⁻⁶	6.41 ± 0.60*	6.54 ± 0.97*	0.00 ± 0.00*
1x10 ⁻⁵	5.68 ± 0.98*	5.04 ± 0.93*	0.00 ± 0.00*
5x10 ⁻⁵	2.20 ± 0.38*	2.44 ± 0.87*	0.00 ± 0.00*
1x10 ⁻⁴	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

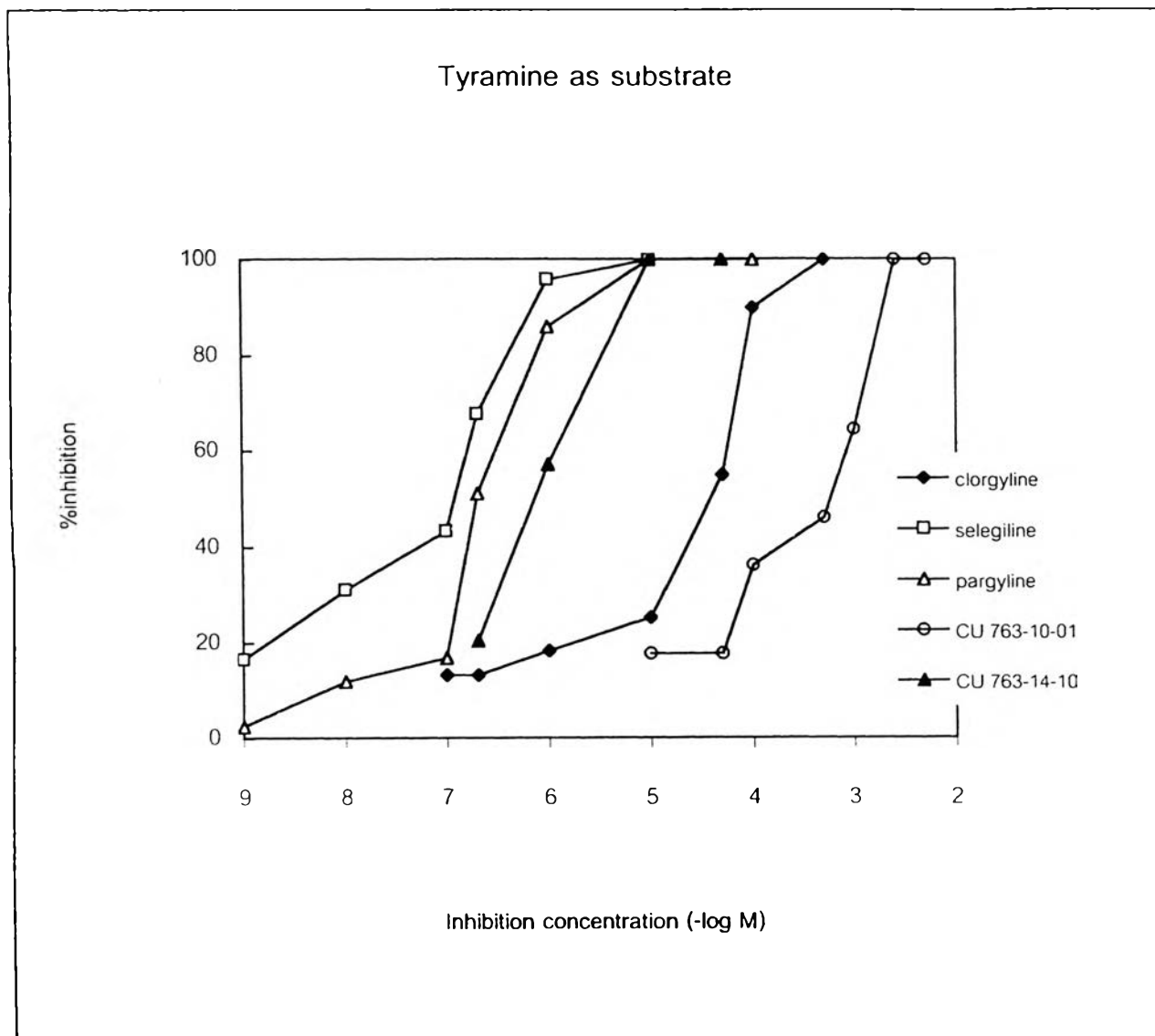
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 µg, ความเข้มข้นของสับสเตรท 100 µM และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.64 (กรณีของ tyramine), 2.87 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 3.04 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ pargyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1x10⁻⁹ - 1x10⁻⁴ M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง



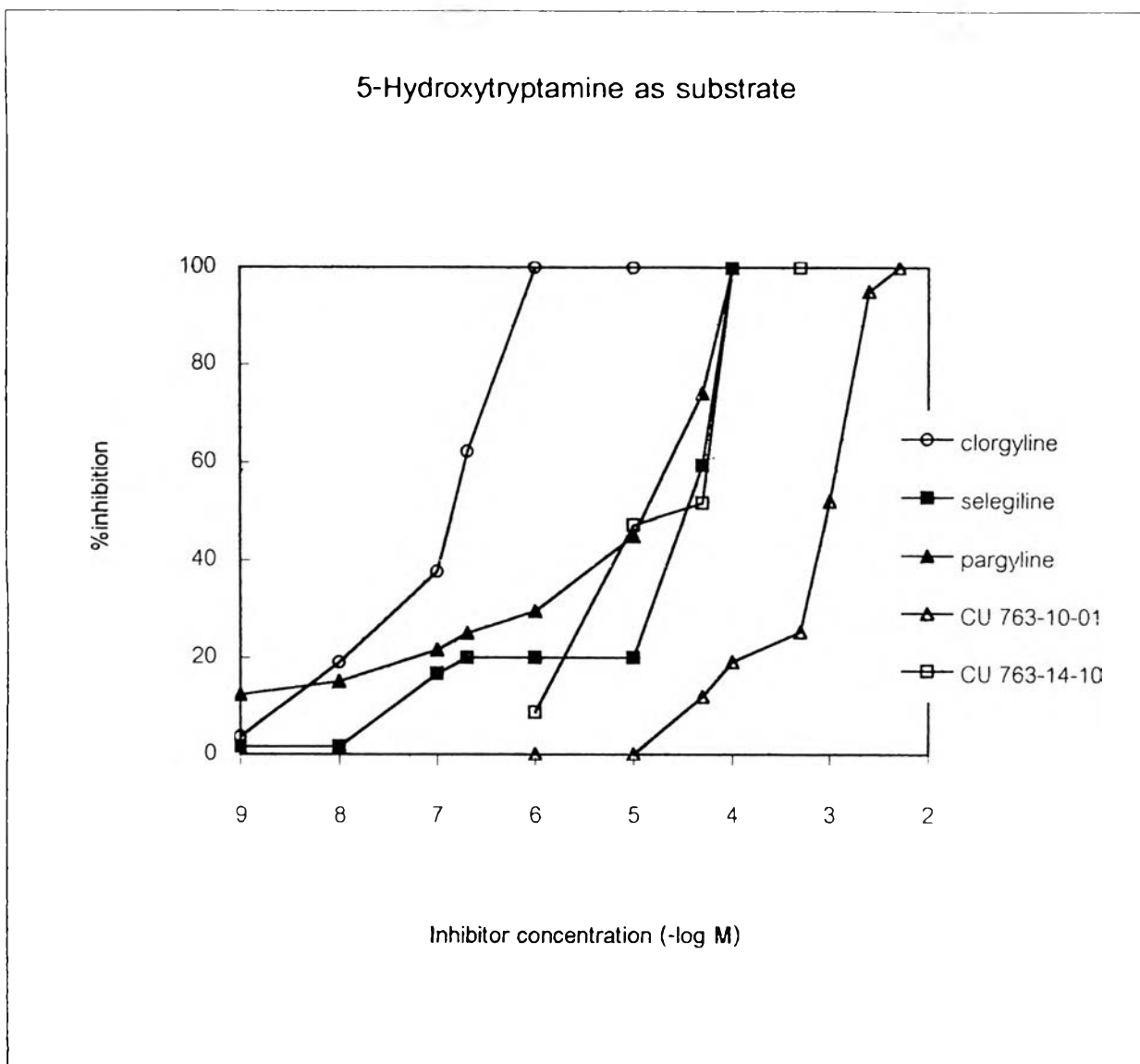
รูปที่ 55 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย pargyline เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, สับสเตรทที่ใช้ในแต่ละการทดลอง 100 μ M และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.64 (กรณีของ tyramine), 2.87 (กรณีของ 5-hydroxytryptamine), 3.04 (กรณีของ benzylamine) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ pargyline ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 1×10^{-4} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



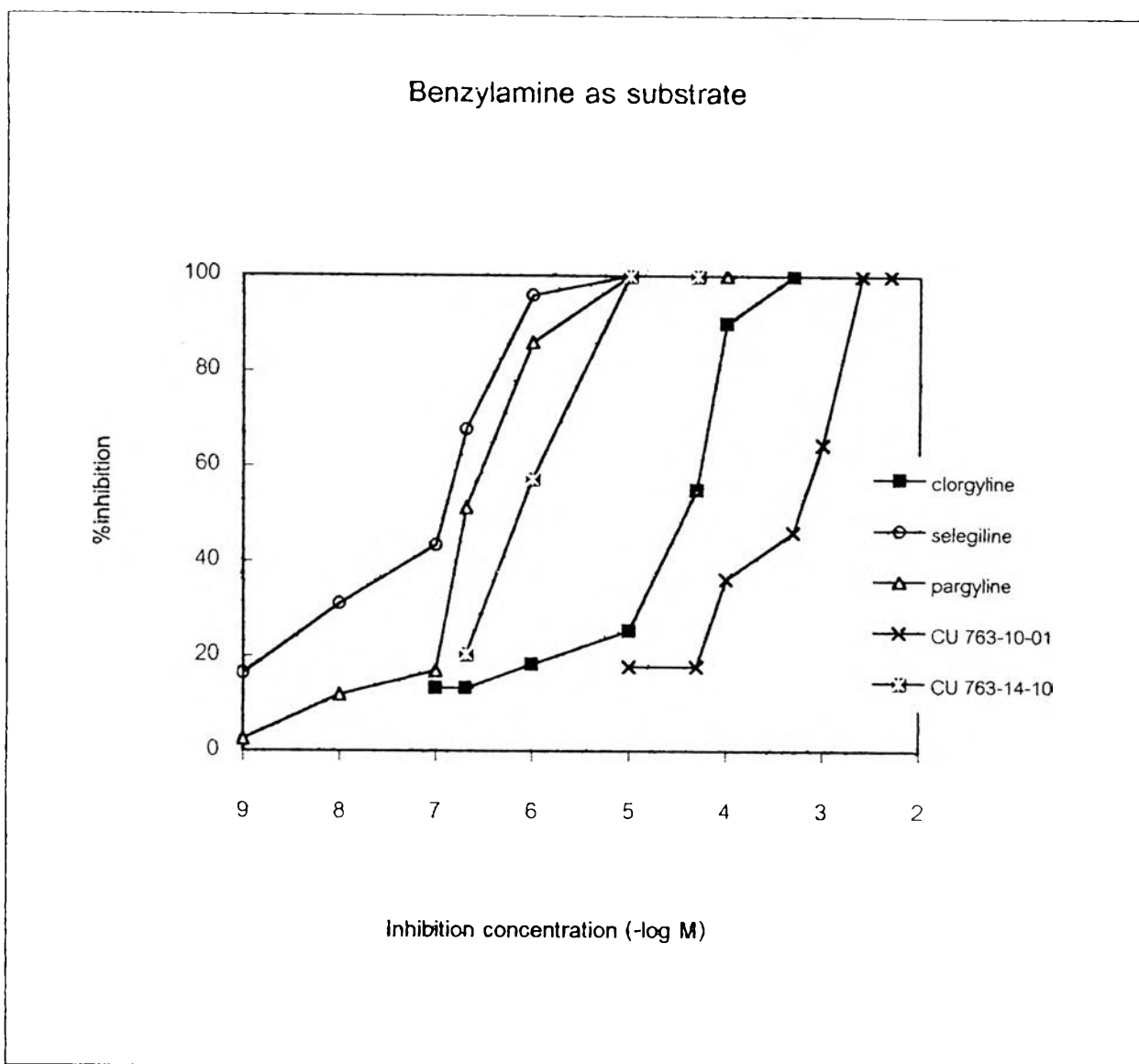
รูปที่ 56 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01, CU 763-14-10, clorgyline, selegiline และ pargyline เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate) 100 μ M เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อน มาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, tyramine 100 μ M และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 (กรณีของ CU 763-10-01), 2.46 (กรณีของ CU 763-14-10), 3.35 (กรณีของ clorgyline), 3.30 (กรณีของ selegiline) และ 2.64 (กรณีของ pargyline) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ inhibitors ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 5×10^{-3} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 57 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01, CU 763-14-10, clorgyline, selegiline และ pargyline เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , 5-hydroxytryptamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 (กรณีของ CU 763-10-01), 2.72 (กรณีของ CU 763-14-10), 3.56 (กรณีของ clorgyline), 2.27 (กรณีของ selegiline) และ 2.87 (กรณีของ pargyline) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ inhibitors ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 5×10^{-3} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 58 เปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดย CU 763-10-01, CU 763-14-10, clorgyline, selegiline และ pargyline เมื่อใช้ benzylamine 100 μM เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , benzylamine 100 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.72 (กรณีของ CU 763-10-01), 2.92 (กรณีของ CU 763-14-10), 3.34 (กรณีของ clorgyline), 2.30 (กรณีของ selegiline) และ 3.04 (กรณีของ pargyline) มก.โปรตีน/มล. ความเข้มข้นของ inhibitors ที่ใช้ตั้งแต่ 1×10^{-9} - 5×10^{-3} M ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตารางที่ 9

แสดงค่า IC_{50} ของ CU 763-10-01 และ CU 763-14-10 เปรียบเทียบกับ clorgyline (MAO-A inhibitor), selegiline (MAO-B inhibitor) และ pargyline (nonspecific inhibitor) ในการยับยั้งเอนไซม์ โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อใช้ tyramine (nonspecific substrate), 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) และ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

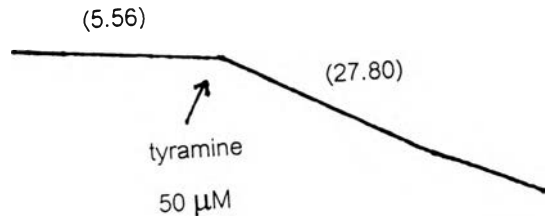
Substrate	Types of MAO	IC_{50} (μ M)				
		CU 763-10-01	CU 763-14-10	Clorgyline (MAO-A inhibitor)	Selegiline (MAO-B inhibitor)	Pargyline (nonspecific inhibitor)
Tyramine	Both types	572.91 \pm 44.41	3.06 \pm 0.35	9.01 \pm 2.05	33.69 \pm 7.70	1.61 \pm 0.40
5-HT	MAO-A	1,062.22 \pm 23.50	18.82 \pm 1.93	0.12 \pm 0.02	48.53 \pm 5.56	20.32 \pm 5.08
Benzylamine	MAO-B	579.75 \pm 0.75	1.90 \pm 0.46	41.08 \pm 0.18	0.27 \pm 0.04	0.55 \pm 0.18

รูปที่ 59 Oxygraph tracings แสดงการออกซิไดซ์สับสเตรทของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate)

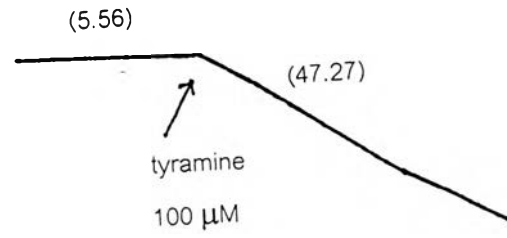
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 3.50 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

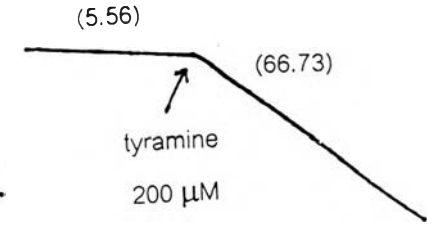
(A)



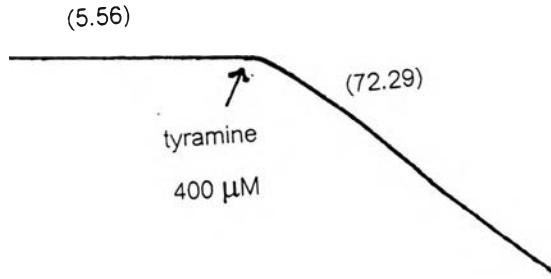
(B)



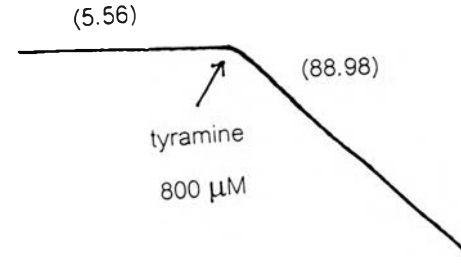
(C)



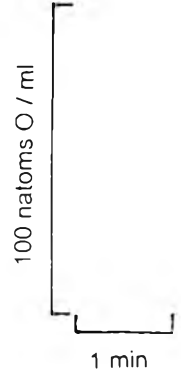
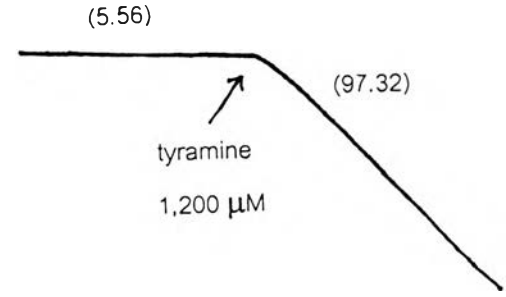
(D)



(E)



(F)

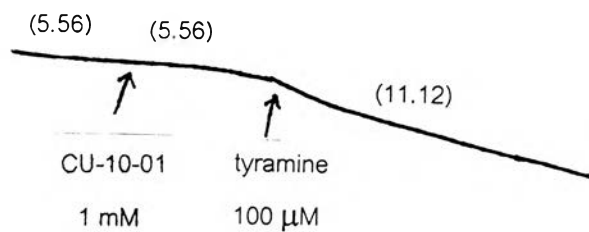


รูปที่ 60 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวด้วย 1 mM CU 763-10-01 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate)

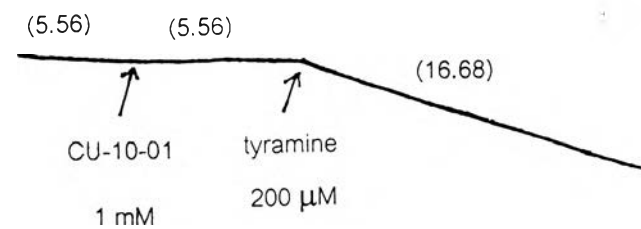
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 3.70 มก./โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-10-01 และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

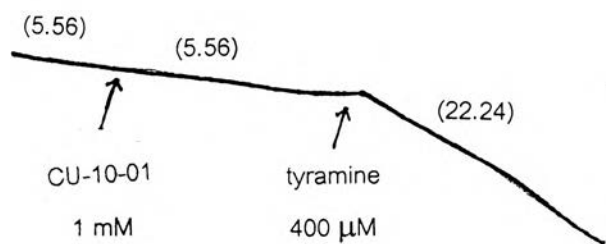
(A)



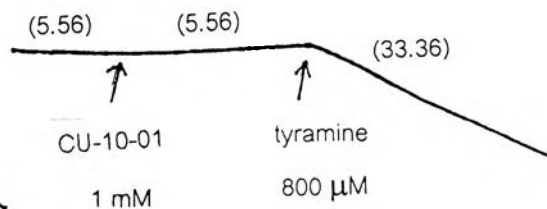
(B)



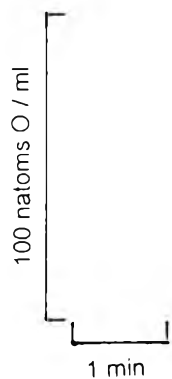
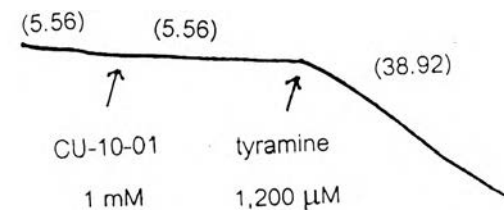
(C)



(D)



(E)



ตารางที่ 10

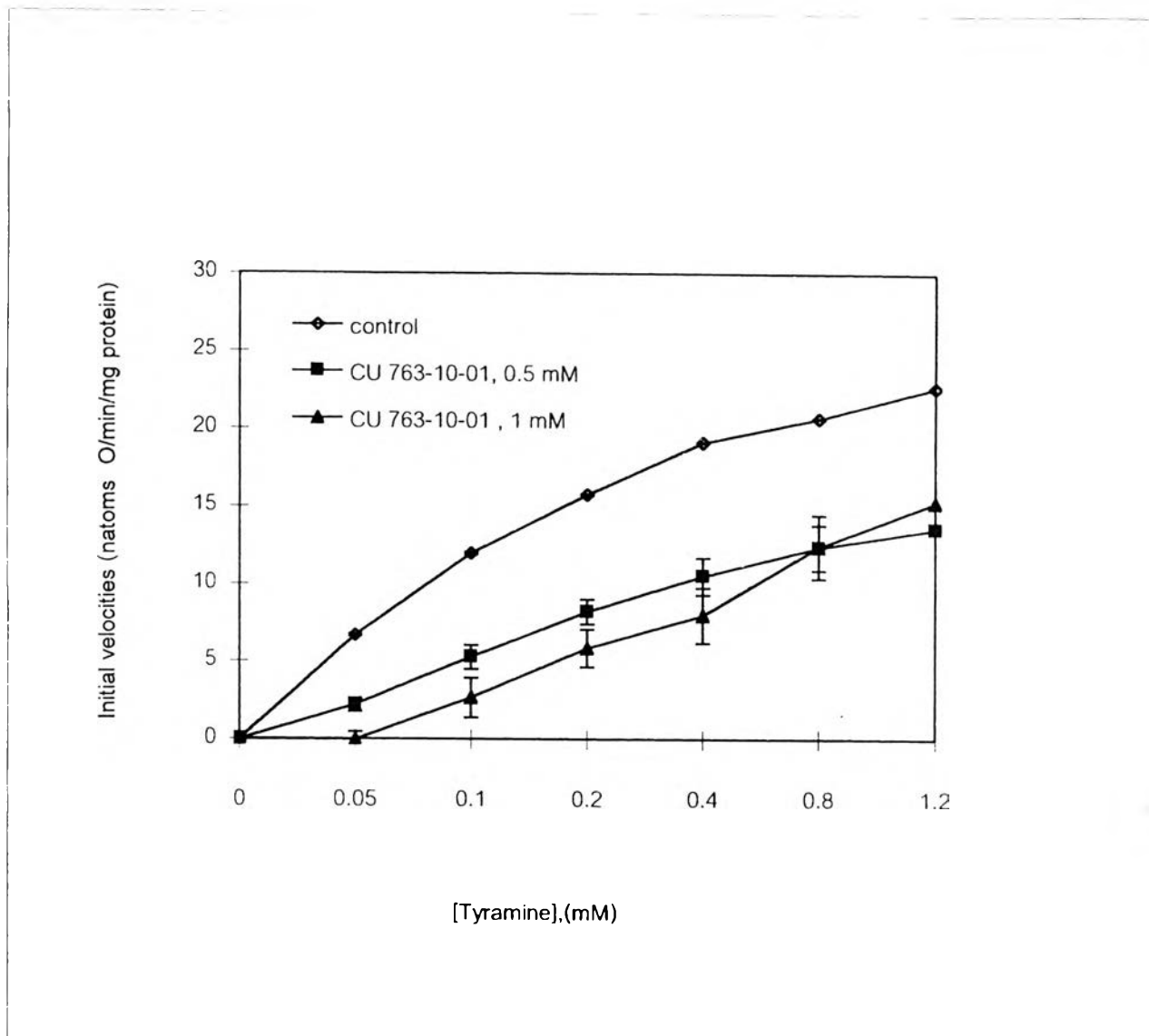
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

Tyramine (mM)	Initial velocities (natoms O / min / mg protein)		
	Control	CU 763-10-01 (0.5 mM)	CU 763-10-01 (1.0 mM)
0.05	6.71 \pm 0.43	2.24 \pm 0.27*	0.00 \pm 0.00**
0.10	12.05 \pm 0.63	5.30 \pm 0.44*	2.69 \pm 0.51**
0.20	15.70 \pm 1.18	8.26 \pm 0.78*	5.90 \pm 1.27**
0.40	19.14 \pm 0.93	10.56 \pm 0.79*	8.00 \pm 1.23**
0.80	20.71 \pm 1.19	12.42 \pm 1.20*	12.45 \pm 1.79*
1.20	22.67 \pm 1.84	13.60 \pm 1.47*	15.32 \pm 2.06**

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

* แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-10-01 (0.5mM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

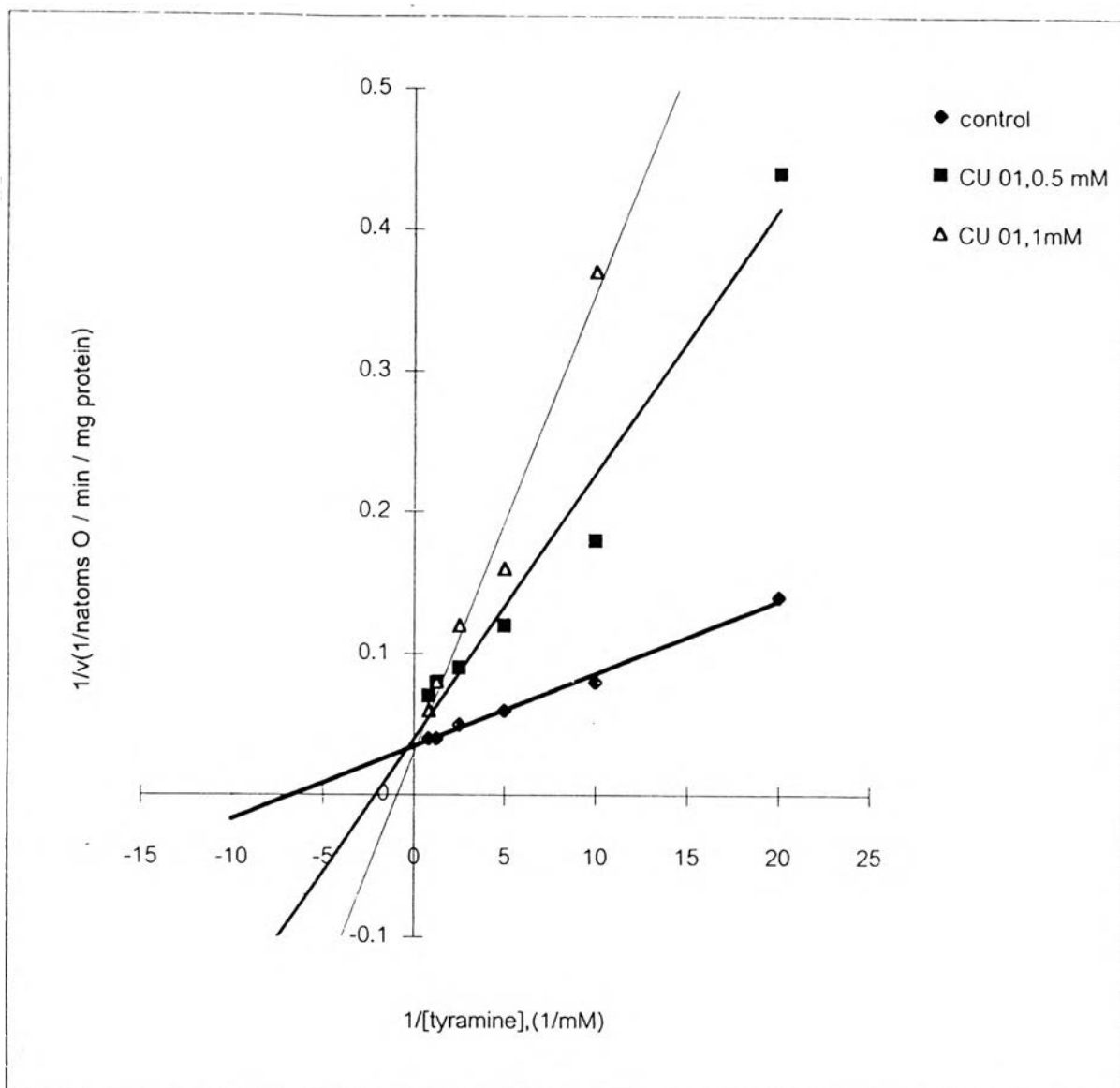
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, tyramine 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.2 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.16 (กรณีของ control), 3.16 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 0.5 mM), 2.93 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 1.0 mM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

รูปที่ 61 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, tyramine 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.2 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.16 (กรณีของ control), 3.16 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 0.5 mM), 2.93 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 1.0 mM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

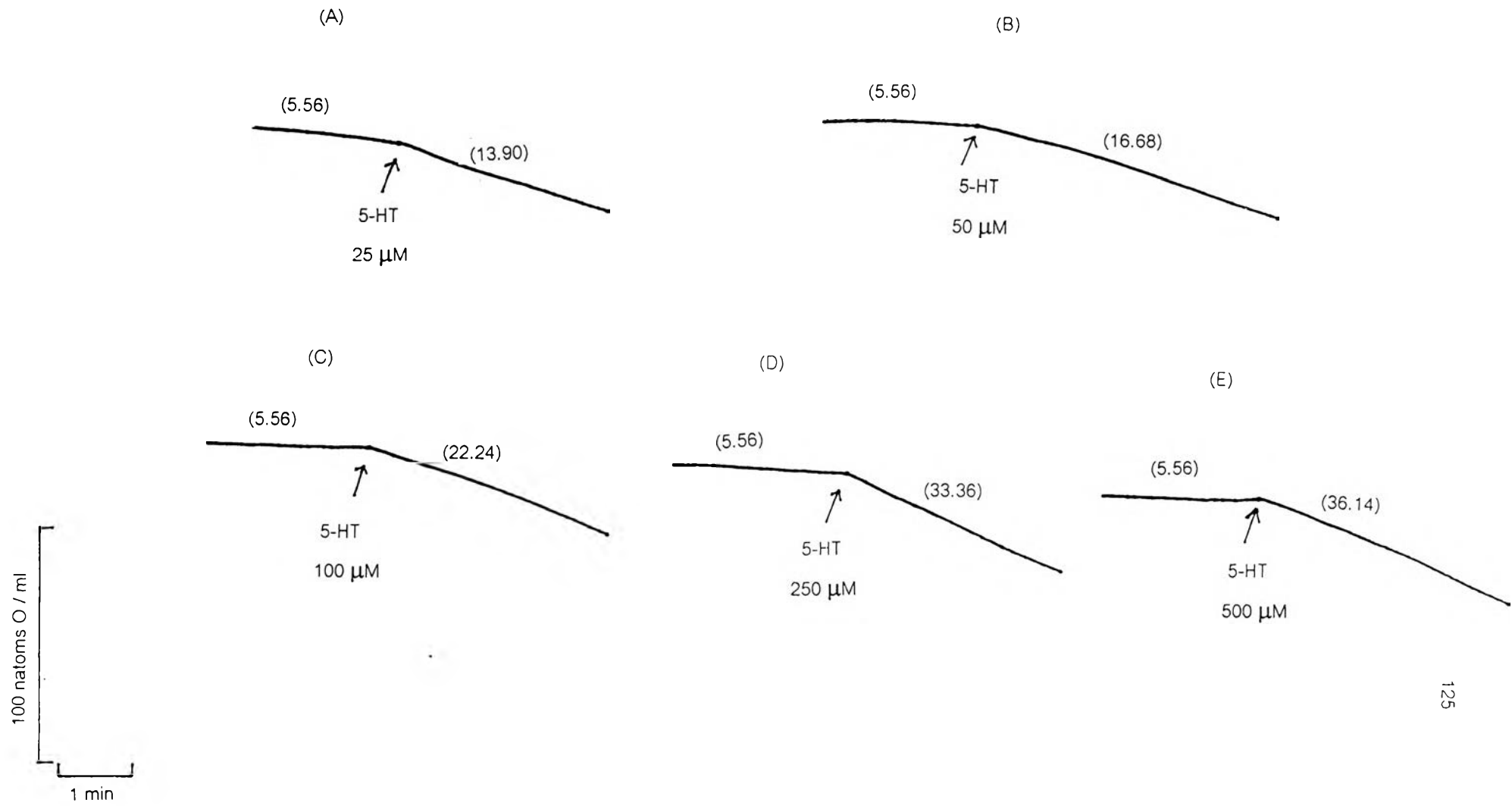


รูปที่ 62 Double-reciprocal plot แสดง kinetics inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (โดยกรณีของ control $y = 0.0052X + 0.0343$; $R^2 = 0.9929$, กรณีของ CU 763-10-01 (0.5 mM) $y = 0.0188X + 0.0394$; $R^2 = 0.9643$ และกรณีของ CU 763-10-01 (1.0 mM) $y = 0.0327X + 0.0301$; $R^2 = 0.9766$)

รูปที่ 63 Oxygraph tracings แสดงการออกซิไดซ์สับสเตรทของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.68 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

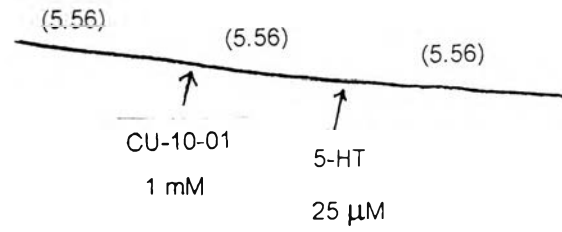


รูปที่ 64 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวด้วย 1 mM CU 763-10-01 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A)

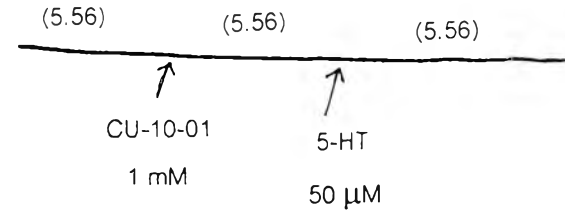
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.91 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-10-01 และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

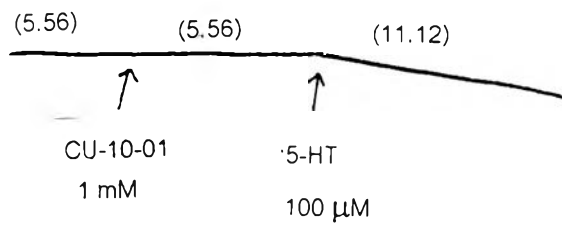
(A)



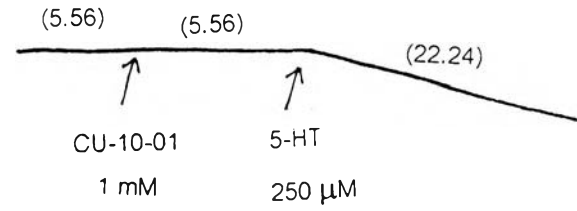
(B)



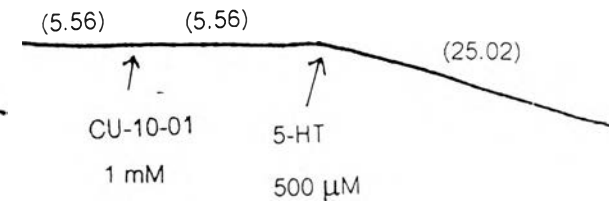
(C)



(D)



(E)



100 natoms O / ml
1 min

ตารางที่ 11

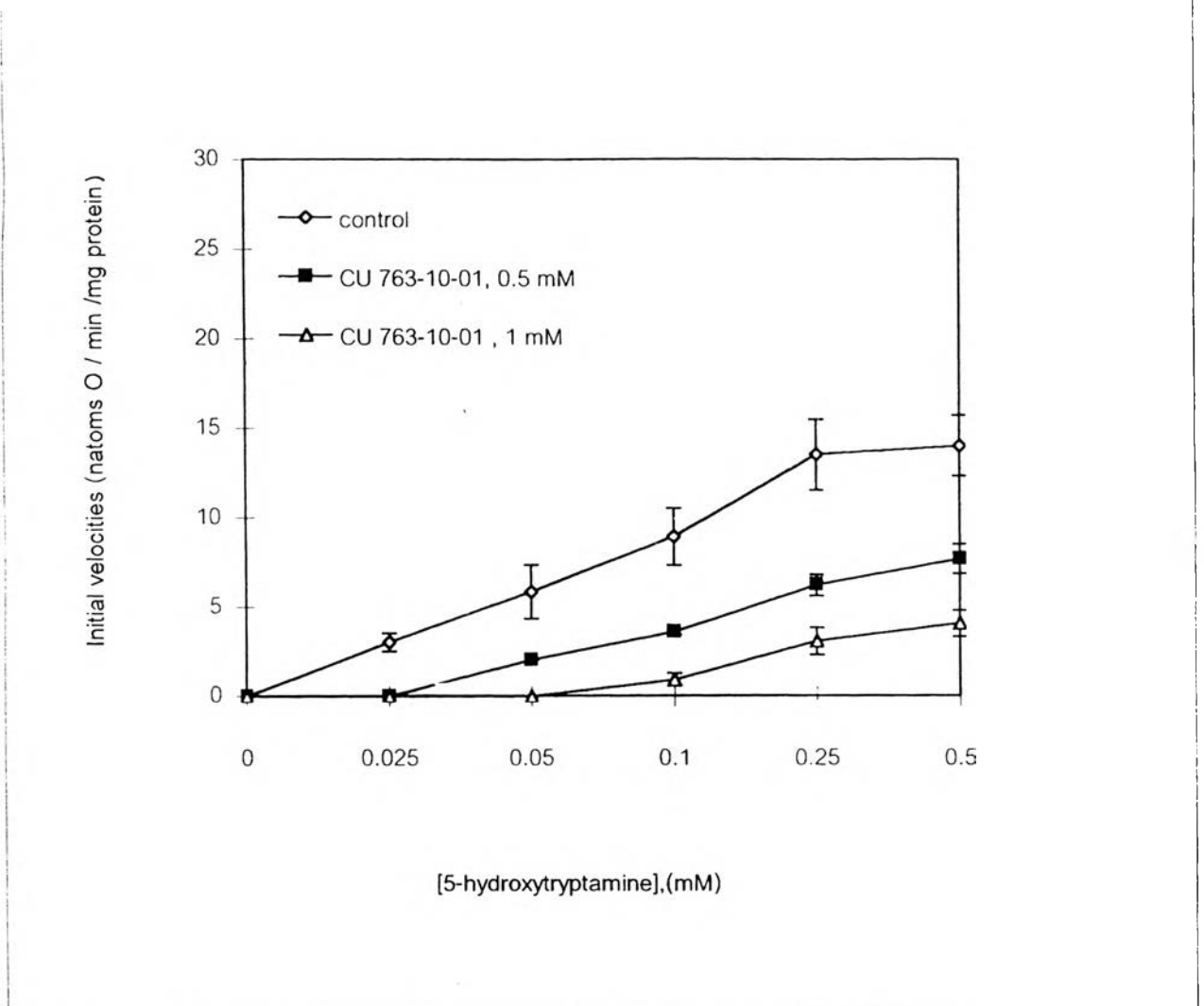
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

5-HT (mM)	Initial velocities (natoms O / min / mg protein)		
	Control	CU 763-10-01 (0.5 mM)	CU 763-10-01 (1.0 mM)
0.025	3.06 \pm 0.52	0.00 \pm 0.00*	0.00 \pm 0.00**
0.050	5.90 \pm 1.51	2.07 \pm 0.15	0.00 \pm 0.00**
0.100	8.96 \pm 1.58	3.62 \pm 0.60	0.95 \pm 0.37**
0.250	13.51 \pm 1.96	6.26 \pm 0.83	3.11 \pm 0.78**
0.500	14.04 \pm 1.70	7.70 \pm 0.34*	4.10 \pm 0.75**

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

* แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-10-01 (0.5mM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

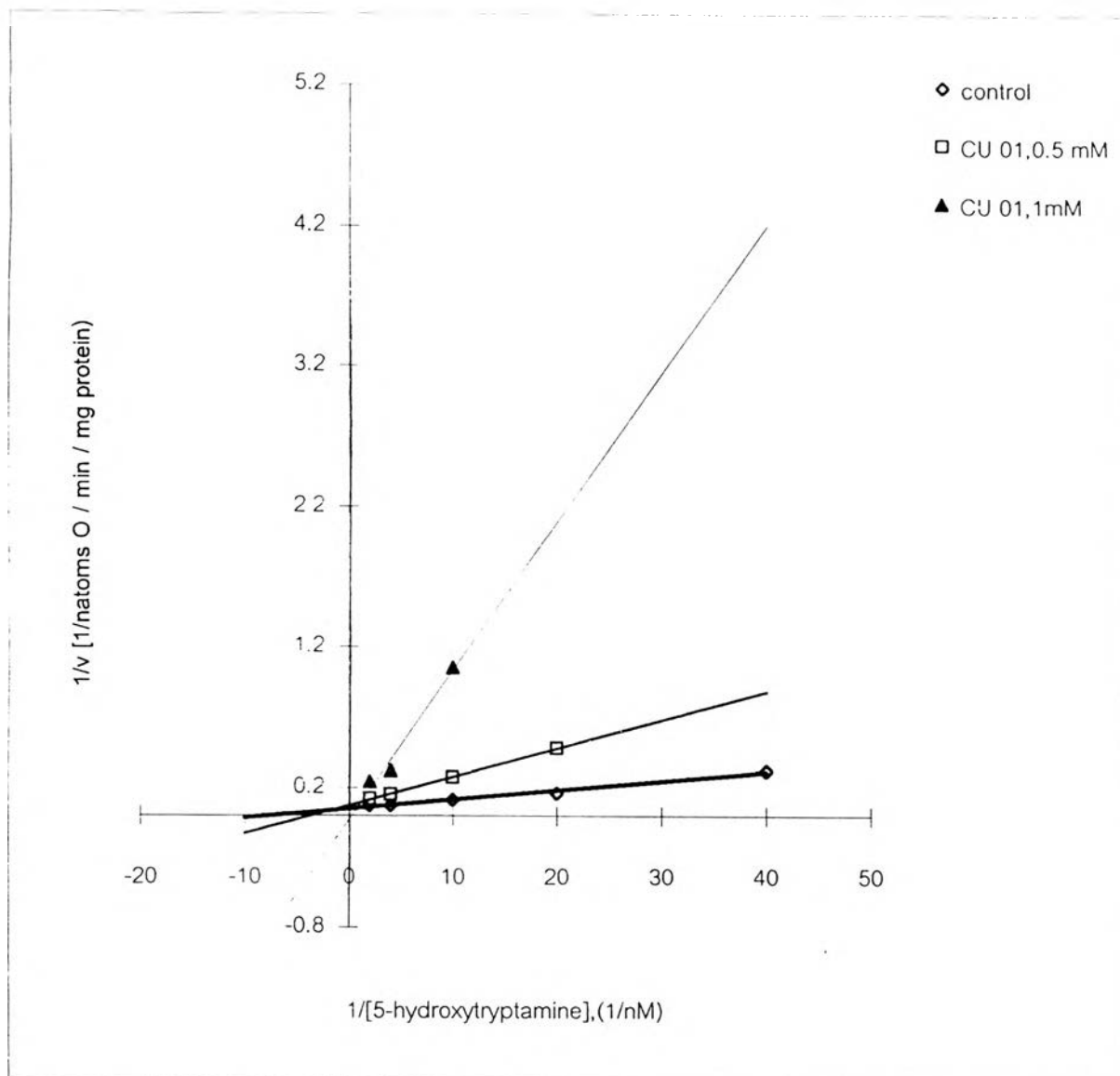
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, 5-hydroxytryptamine 0.025, 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.66 (กรณีของ control), 2.73 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 0.5 mM), 2.83 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 1.0 mM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

รูปที่ 65 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, 5-hydroxytryptamine 0.025, 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 mM และไมโทคอนเดรียเฉลี่ย 2.66 (กรณีของ control), 2.73 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 0.5 mM), 2.83 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 1.0 mM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

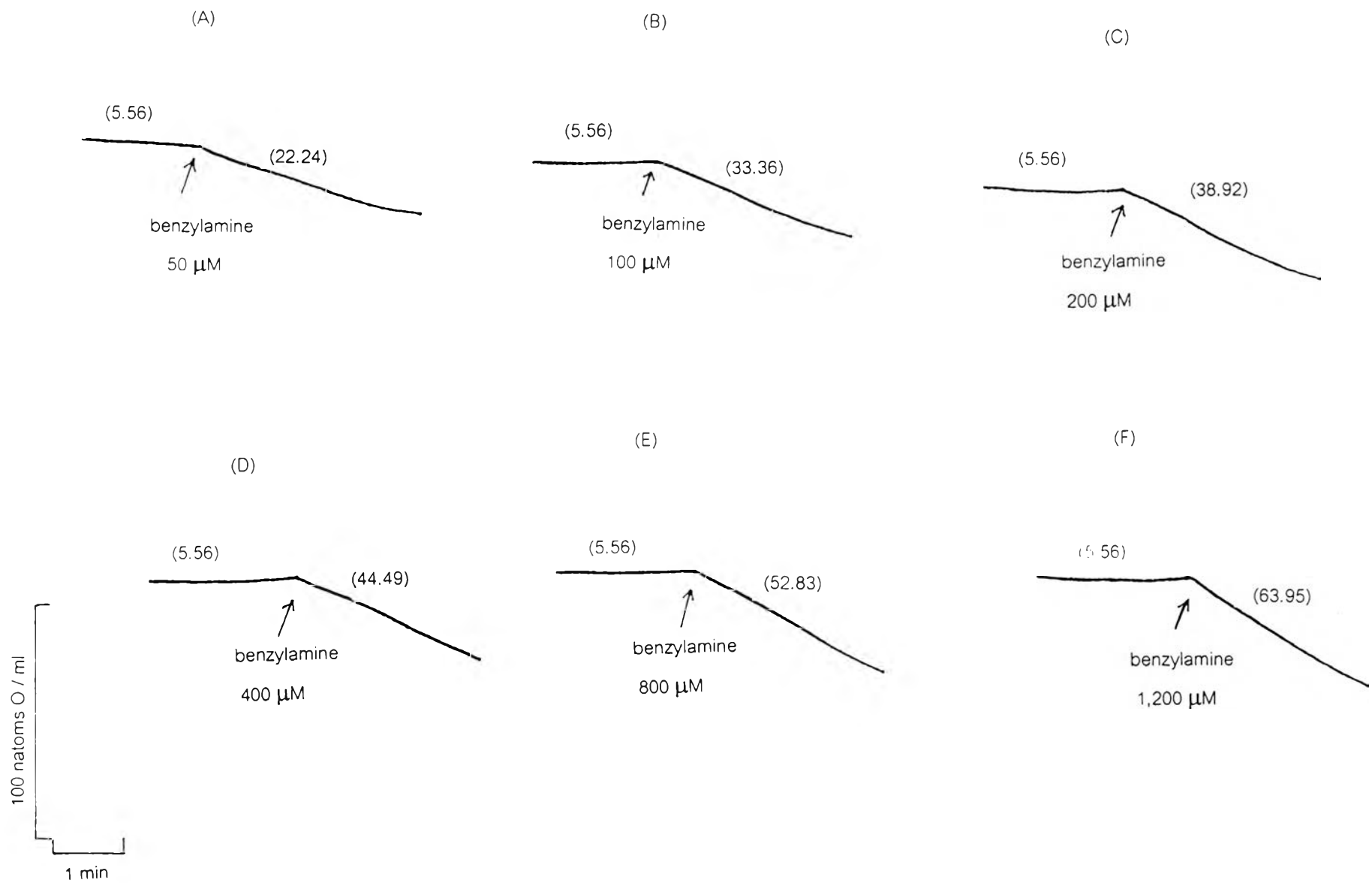


รูปที่ 66 Double-reciprocal plot แสดง kinetics inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (โดยกรณีของ control $y = 0.0066X + 0.0467$; $R^2 = 0.9887$, กรณีของ CU 763-10-01 (0.5 mM) $y = 0.0202X + 0.0732$; $R^2 = 0.9989$ และกรณีของ CU 763-10-01 (1.0 mM) $y = 0.106X - 0.0285$; $R^2 = 0.9768$)

รูปที่ 67 Oxygraph tracings แสดงการออกซิไดซ์สับสเตรทของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 3.09 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

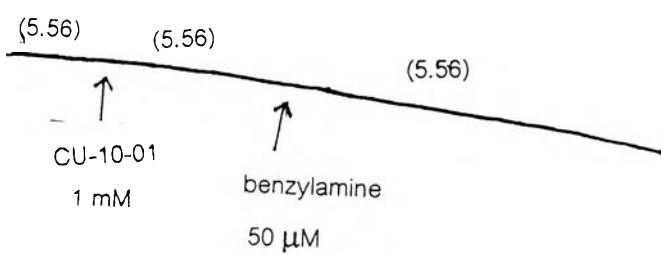


รูปที่ 68 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวด้วย 1 mM CU 763-10-01 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B)

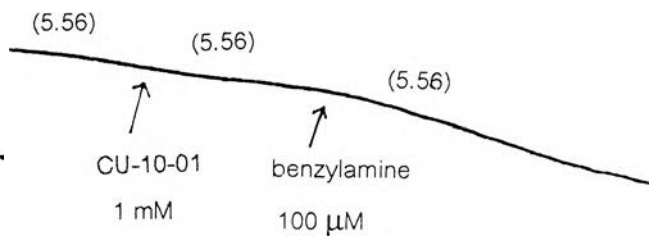
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 3.09 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-10-01 และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

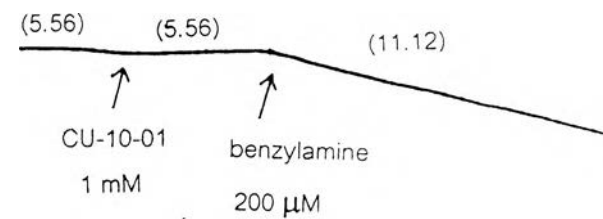
(A)



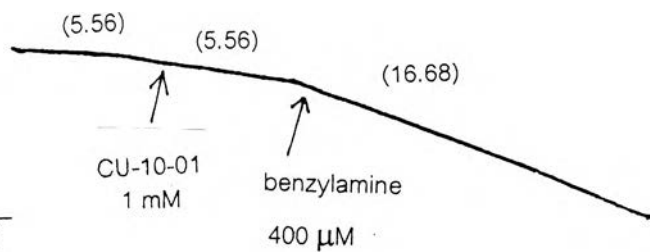
(B)



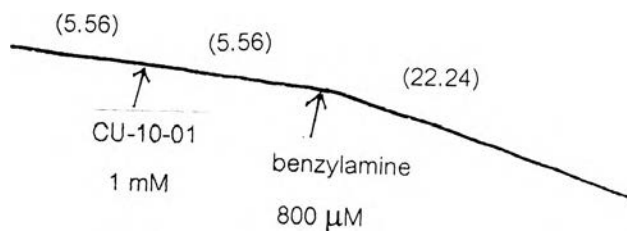
(C)



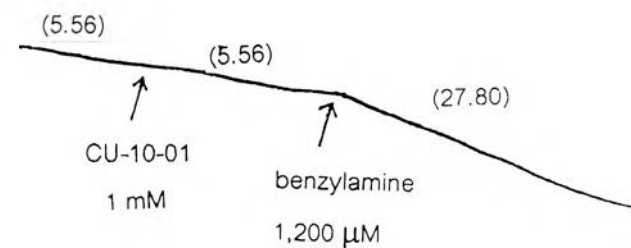
(D)



(E)



(F)



100 natoms O / ml

1 min

ตารางที่ 12

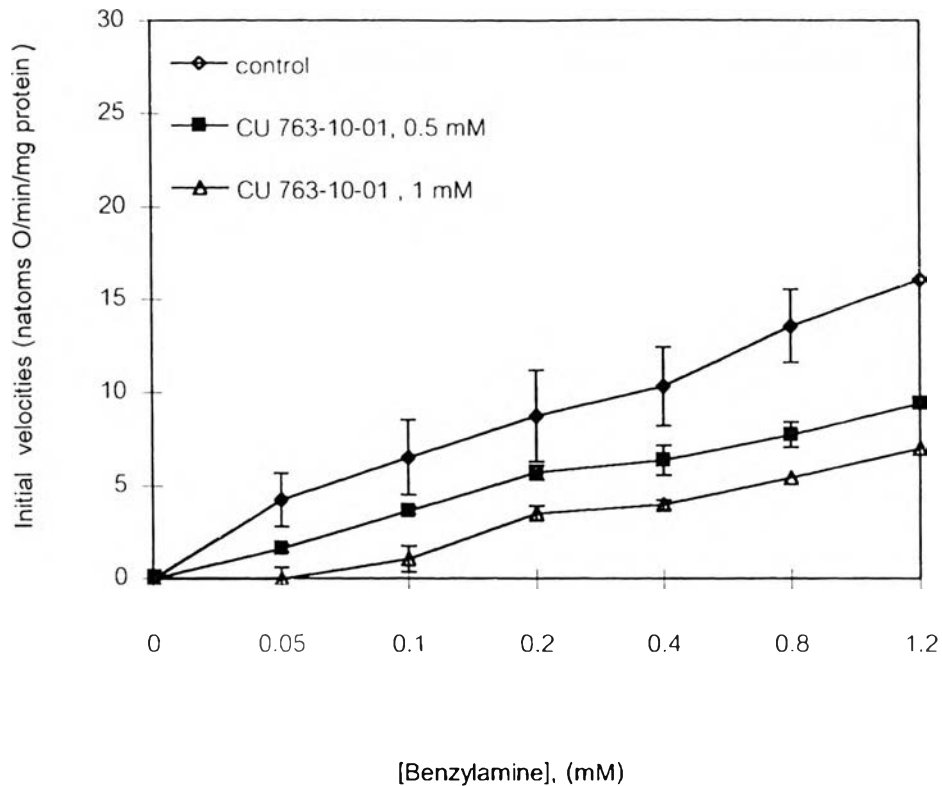
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

Benzylamine (mM)	Initial velocities (natoms O / min / mg protein)		
	Control	CU 763-10-01 (0.5 mM)	CU 763-10-01 (1.0 mM)
0.05	4.27 \pm 0.67	1.65 \pm 0.29*	0.00 \pm 0.00**
0.10	6.54 \pm 1.30	3.69 \pm 0.22	1.09 \pm 0.63**
0.20	8.77 \pm 1.27	5.72 \pm 0.20	3.54 \pm 0.69
0.40	10.36 \pm 1.35	6.38 \pm 0.40	4.00 \pm 0.41**
0.80	13.61 \pm 1.79	7.77 \pm 0.81*	5.45 \pm 0.28*
1.20	15.62 \pm 2.23	9.41 \pm 0.69*	7.01 \pm 0.27**

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

★ แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-10-01 (0.5mM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

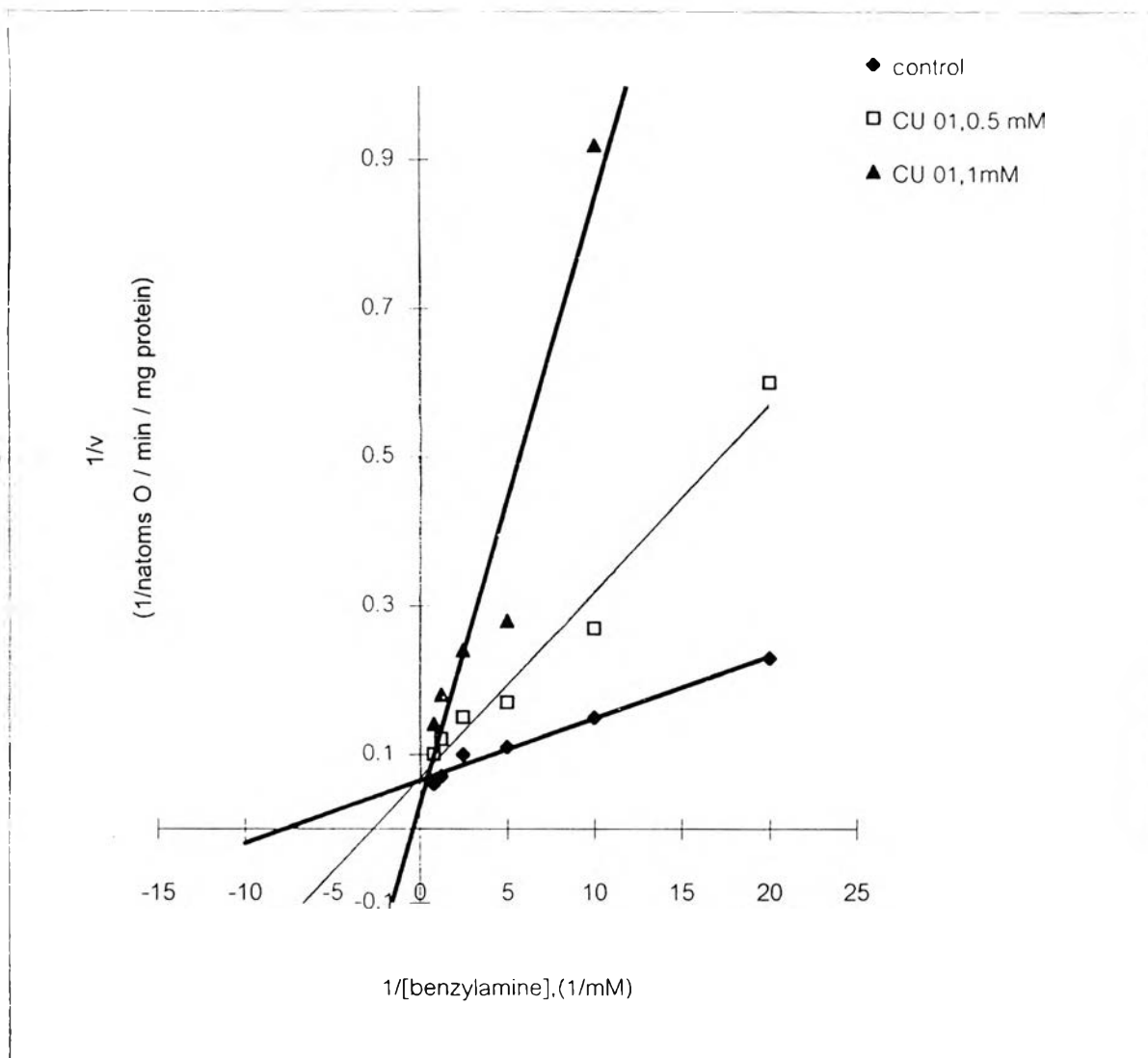
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, benzylamine 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 และ 1.20 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.09 (กรณีของ control), 3.05 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 0.5 mM), 3.09 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 1.0 mM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

รูปที่ 69 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, benzylamine 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 และ 1.20 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.09 (กรณีของ control), 3.05 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 0.5 mM), 3.09 (กรณีที่ใช้ CU 763-10-01 = 1.0 mM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

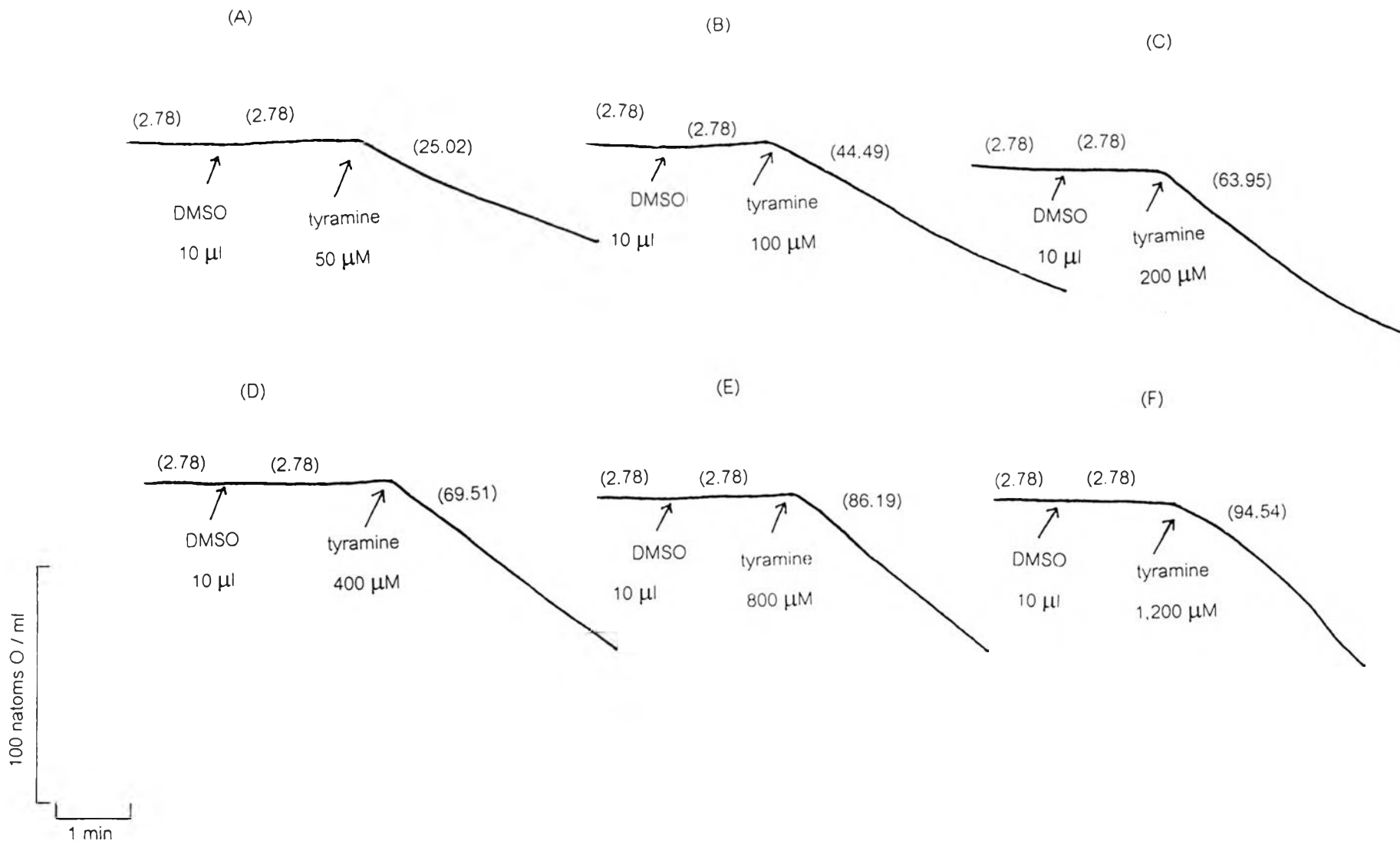


รูปที่ 70 Double-reciprocal plot แสดง kinetics inhibition ของเบนไซมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-10-01 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (โดยกรณีของ control $y = 0.0084X + 0.0646$; $R^2 = 0.9802$, กรณีของ CU 763-10-01 (0.5 mM) $y = 0.0252X + 0.069$; $R^2 = 0.9700$ และกรณีของ CU 763-10-01 (1.0 mM) $y = 0.0818X + 0.0316$; $R^2 = 0.9100$)

รูปที่ 71 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย DMSO เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.83 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ DMSO 10 μ l และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

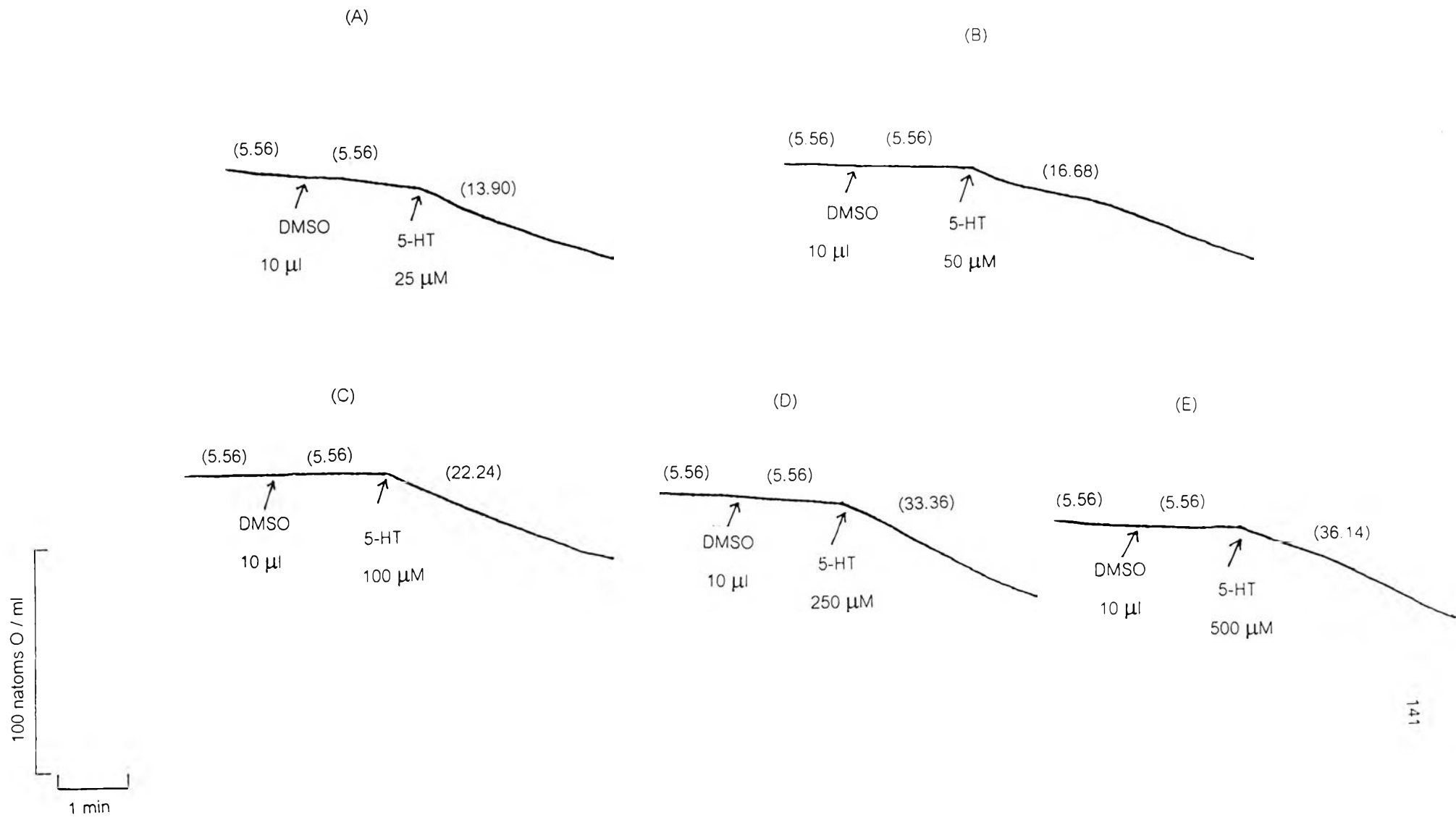
ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที



รูปที่ 72 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย DMSO เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.83 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ DMSO 10 μ l และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

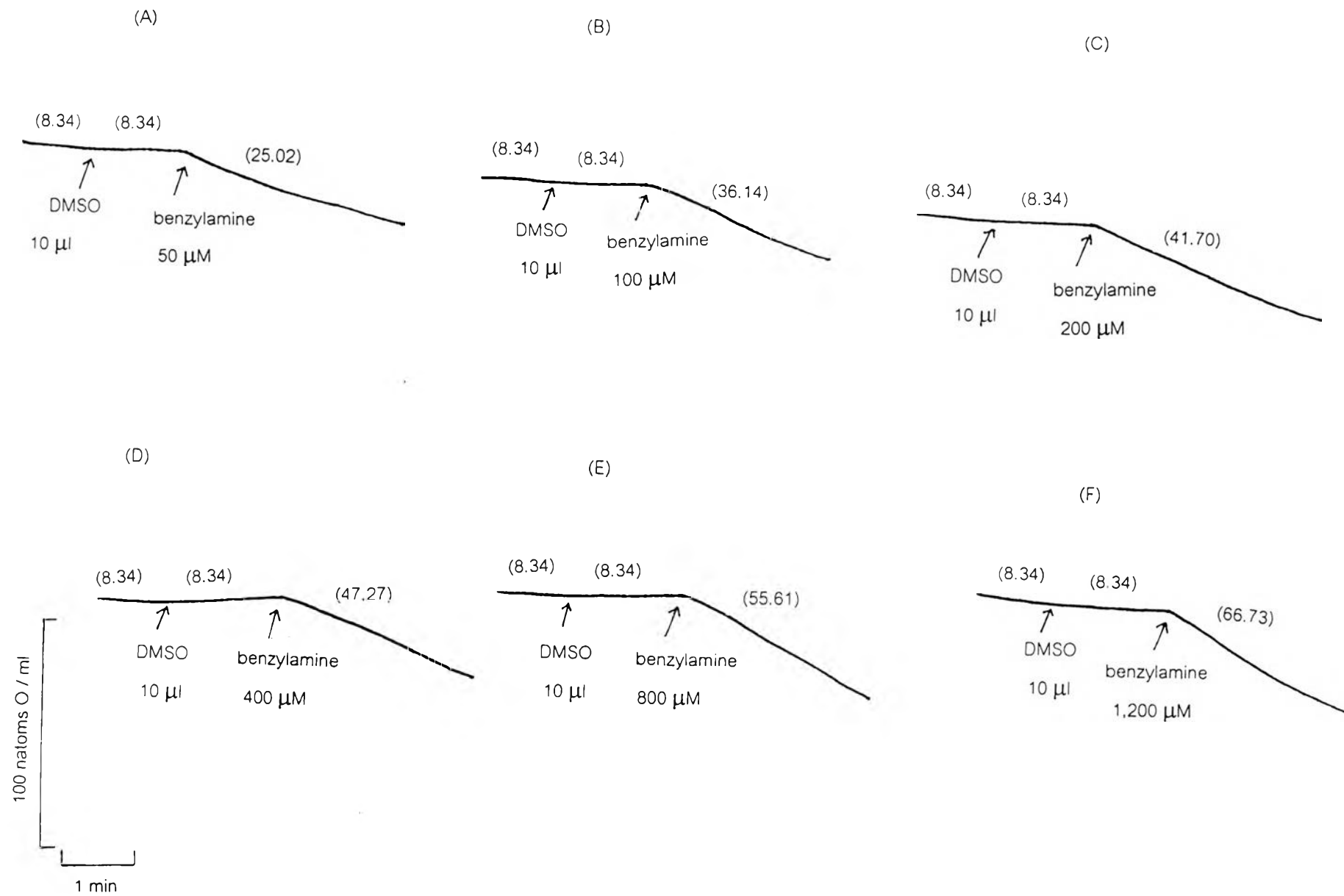
ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที



รูปที่ 73 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย DMSO เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 3.17 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ DMSO 10 μ l และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

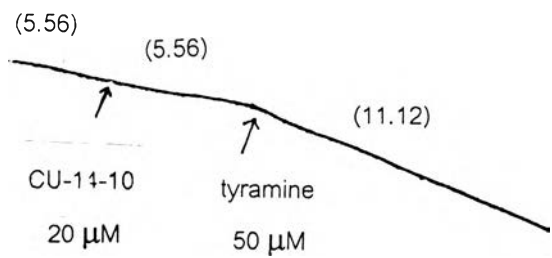


รูปที่ 74 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ขนาด 20 μ M เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate)

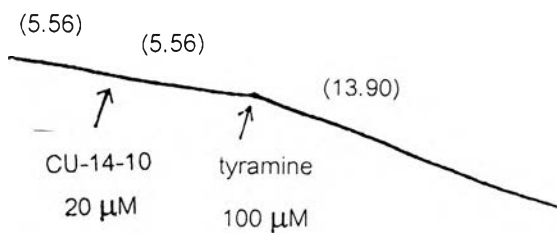
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.83 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-14-10 ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO และ tyramine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

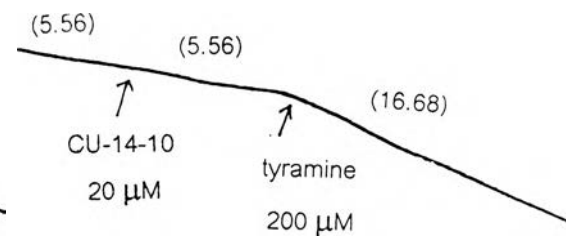
(A)



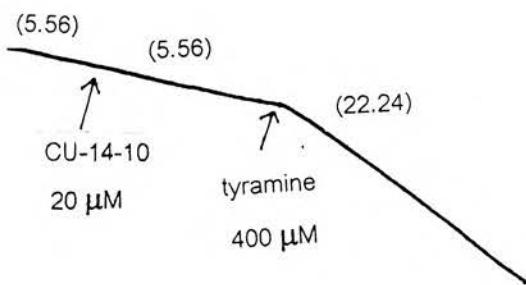
(B)



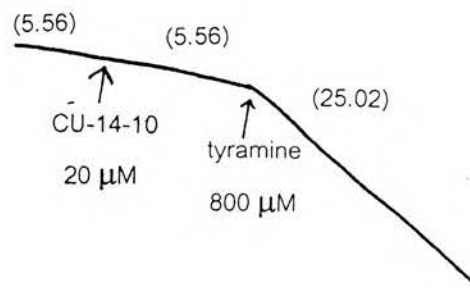
(C)



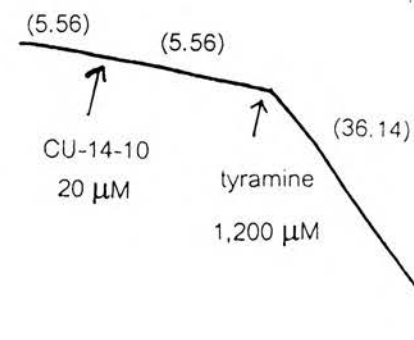
(D)



(E)



(F)



100 natoms O / ml

1 min

ตารางที่ 13

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

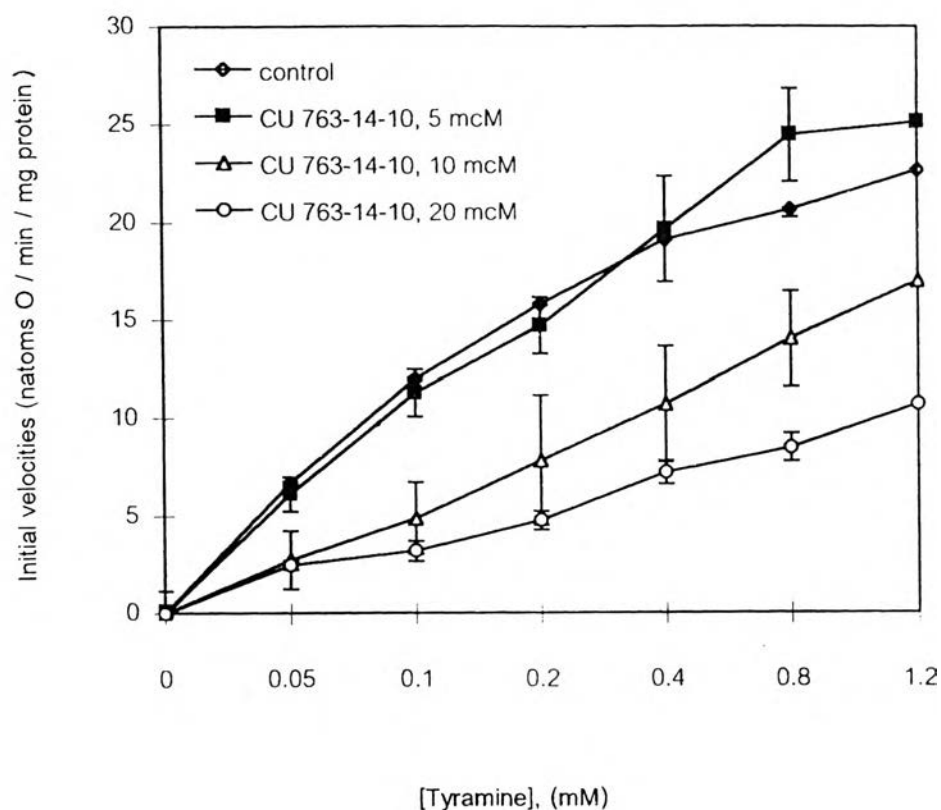
Tyramine (mM)	Initial velocities (natoms O / min / mg protein)				
	Control	DMSO (10 μl)	CU 763-14-10 (5 μM)	CU 763-14-10 (10 μM)	CU 763-14-10 (20 μM)
0.05	6.71 \pm 0.43	6.71 \pm 0.43	6.14 \pm 0.47	2.76 \pm 1.16	2.50 \pm 0.37**
0.10	12.05 \pm 0.63	12.05 \pm 0.63	11.30 \pm 0.87	4.91 \pm 1.50*	3.22 \pm 0.35**
0.20	15.70 \pm 1.18	15.70 \pm 1.18	14.71 \pm 1.20	7.85 \pm 1.86*	4.78 \pm 0.32**
0.40	19.14 \pm 0.93	19.14 \pm 0.93	19.67 \pm 1.46	10.74 \pm 3.32	7.24 \pm 0.46**
0.80	20.71 \pm 1.19	20.71 \pm 1.19	24.50 \pm 2.73	14.04 \pm 2.94	8.53 \pm 0.84**
1.20	22.67 \pm 1.84	22.67 \pm 1.84	25.14 \pm 2.40	16.99 \pm 2.44	10.70 \pm 0.08**

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

☆ แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-14-10 (5 μM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

♣ แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-14-10 (10 μM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

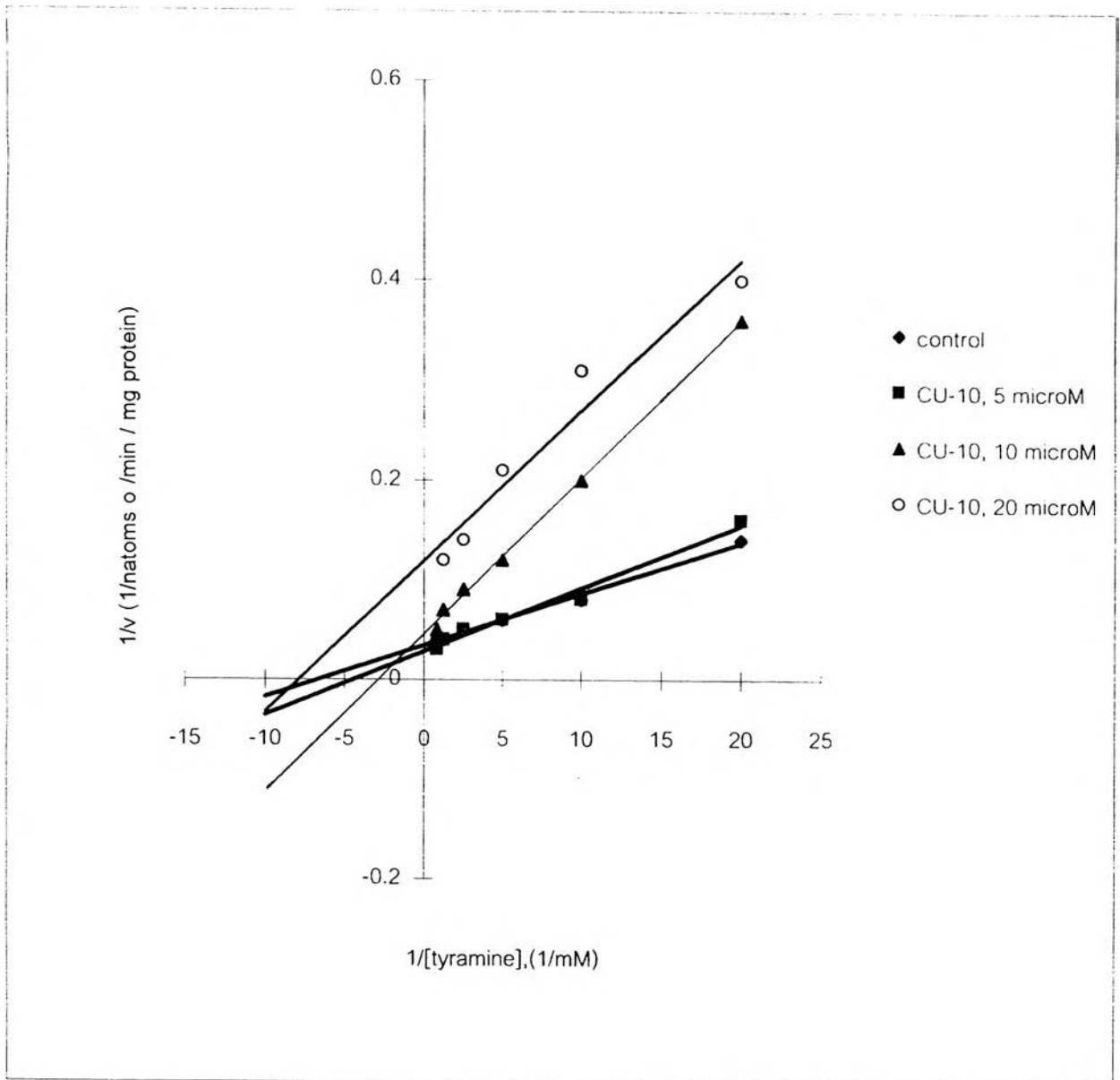
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.2 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.16 (กรณีของ control), 2.88 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 5 μM), 3.29 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 10 μM) และ 2.60 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 20 μM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

รูปที่ 75 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ tyramine (nonspecific substrate) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , tyramine 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.2 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.16 (กรณีของ control), 2.88 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 5 μM), 3.29 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 10 μM) และ 2.60 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 20 μM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

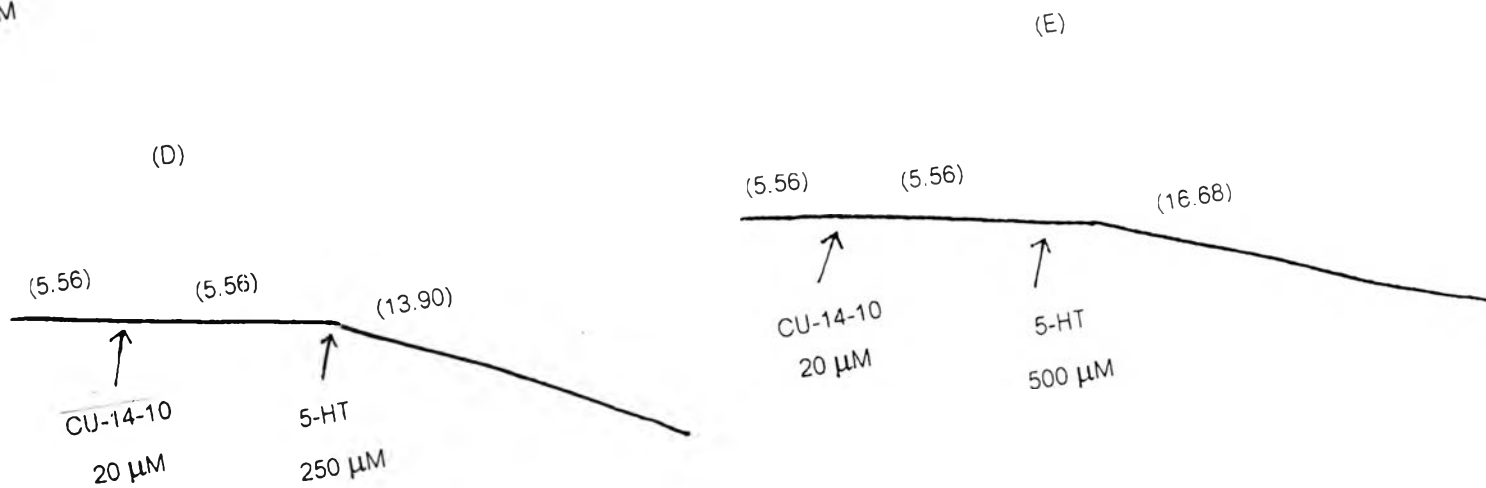
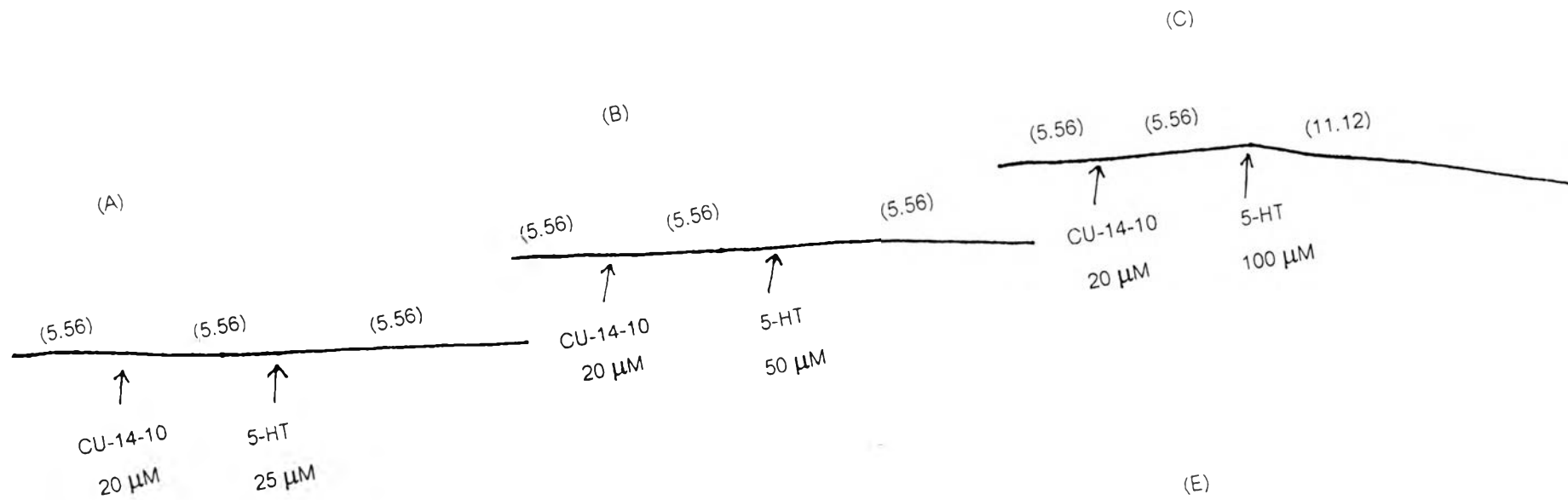


รูปที่ 76 Double-reciprocal plot แสดง kinetics inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM เมื่อใช้ tyramine เป็นสับสเตรท ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (โดยกรณีของ control $y = 0.0052X + 0.0343$; $R^2 = 0.9929$, กรณีของ CU 763-14-10 (5 μM) $y = 0.0063X + 0.0281$; $R^2 = 0.9802$, กรณีของ CU 763-14-10 (10 μM) $y = 0.0157X + 0.0446$; $R^2 = 0.9979$ และกรณีของ CU 763-14-10 (20 μM) $y = 0.0151X + 0.1192$; $R^2 = 0.9483$)

รูปที่ 77 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ขนาด 20 μ M เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μ g, ไมโตคอนเดรีย 2.83 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-14-10 ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO และ 5-hydroxytryptamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที



100 natoms O / ml
1 min

ตารางที่ 14

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

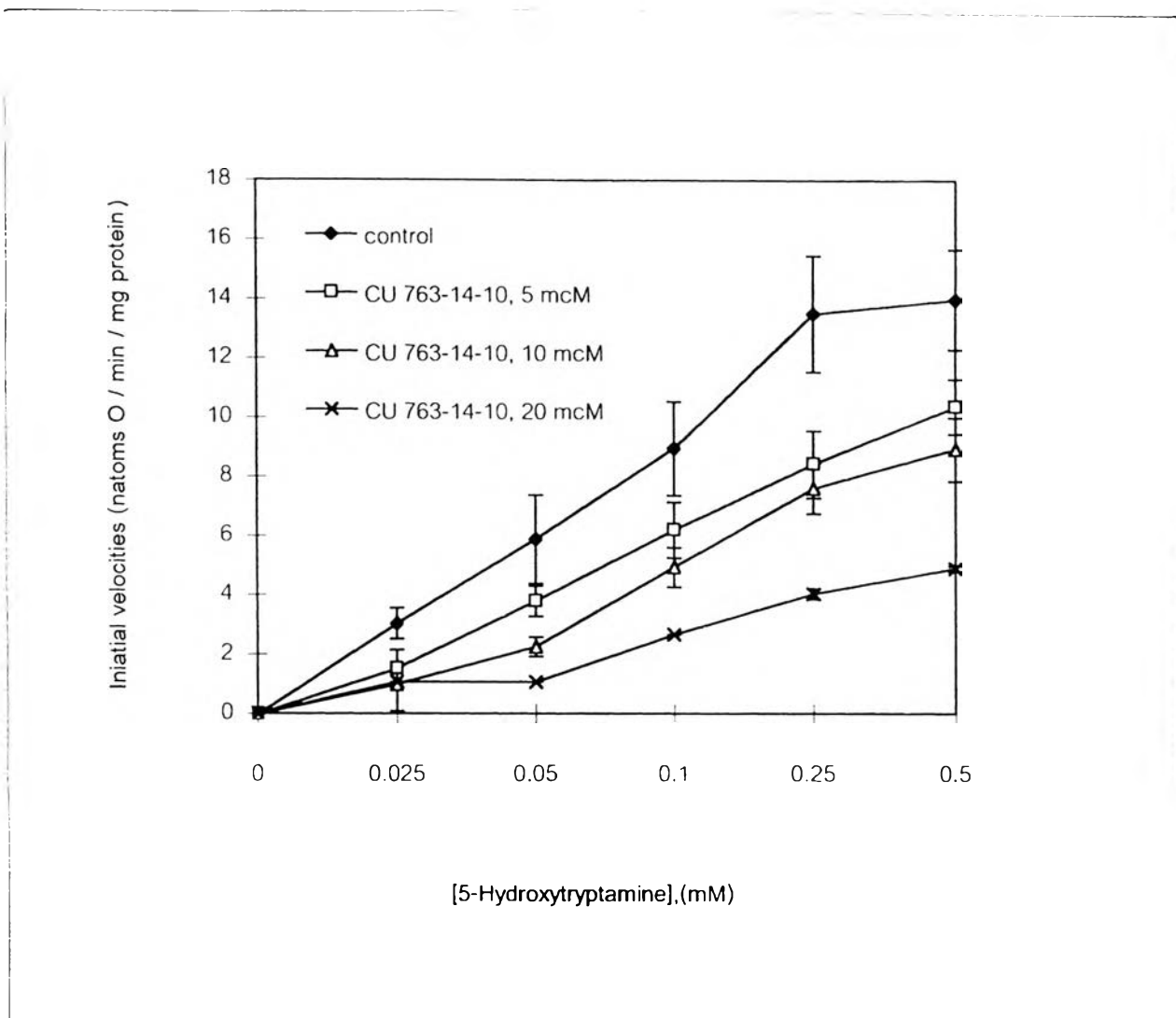
5-HT (mM)	Initial velocities (natoms O / min / mg protein)				
	Control	DMSO (10 μl)	CU 763-14-10 (5 μM)	CU 763-14-10 (10 μM)	CU 763-14-10 (20 μM)
0.025	3.06 \pm 0.52	3.06 \pm 0.52	1.54 \pm 0.65	1.01 \pm 0.09*	1.08 \pm 0.15* [☆]
0.050	5.90 \pm 1.51	5.90 \pm 1.51	3.81 \pm 0.52	2.27 \pm 0.33	1.08 \pm 0.15* [☆] [◆]
0.100	8.96 \pm 1.58	8.96 \pm 1.58	6.19 \pm 0.95	4.95 \pm 0.66	2.67 \pm 0.37* [☆]
0.250	13.51 \pm 1.96	13.51 \pm 1.96	8.43 \pm 1.15	7.62 \pm 0.87	4.05 \pm 0.38* [☆]
0.500	14.04 \pm 1.70	14.04 \pm 1.70	10.39 \pm 0.94	8.94 \pm 1.07	4.91 \pm 0.52* [☆]

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

☆ แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-14-10 (5 μM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

◆ แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-14-10 (10 μM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

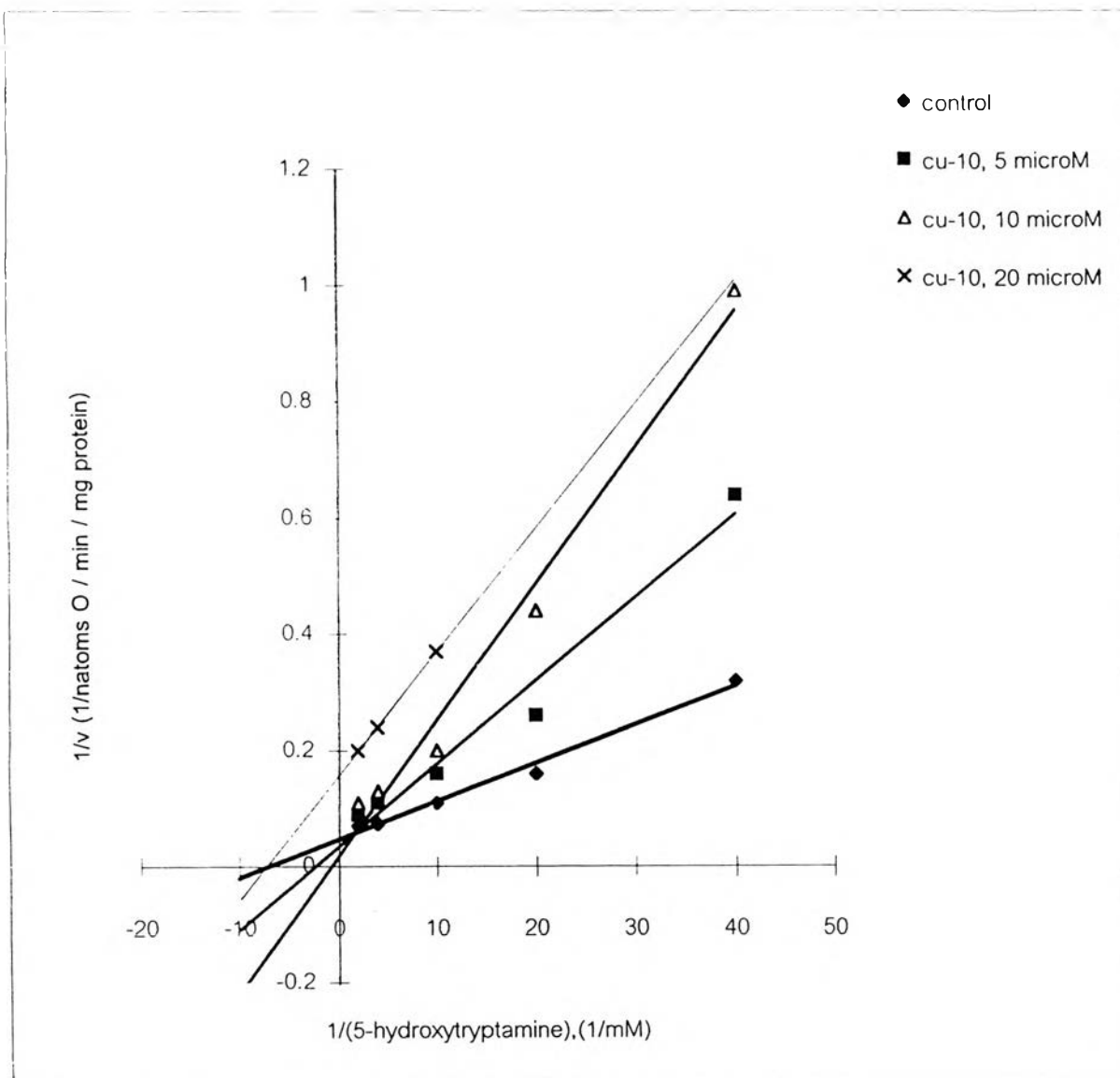
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , 5-hydroxytryptamine 0.025, 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.66 (กรณีของ control), 2.83 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 5 μM), 2.83 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 10 μM) และ 2.60 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 20 μM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

รูปที่ 78 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , 5-hydroxytryptamine 0.025, 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 mM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 2.66 (กรณีของ control), 2.83 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 5 μM), 2.83 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 10 μM) และ 2.60 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 20 μM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

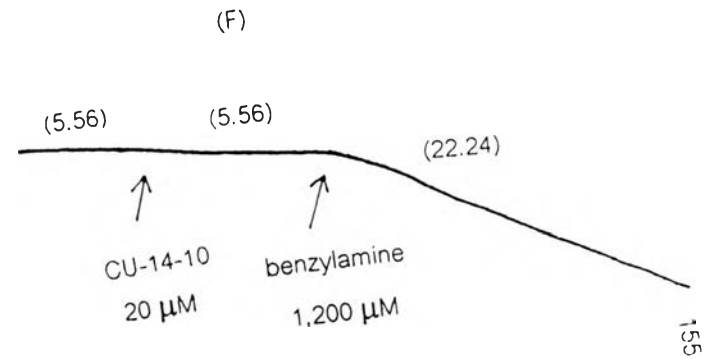
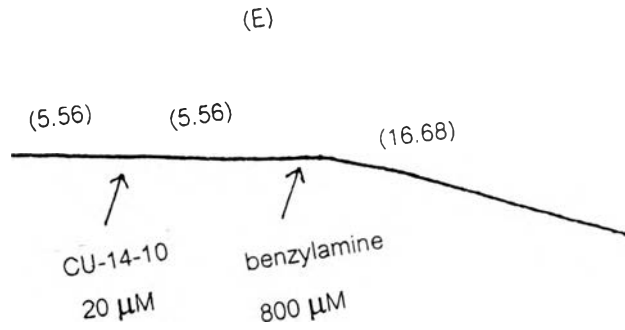
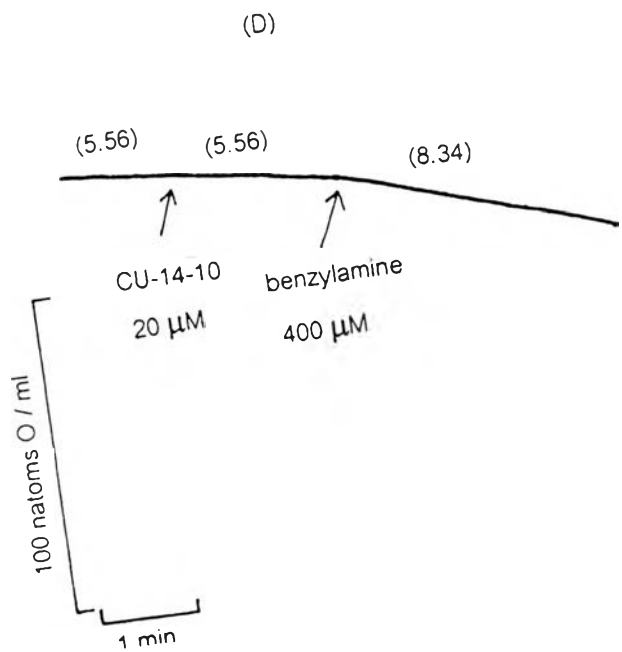
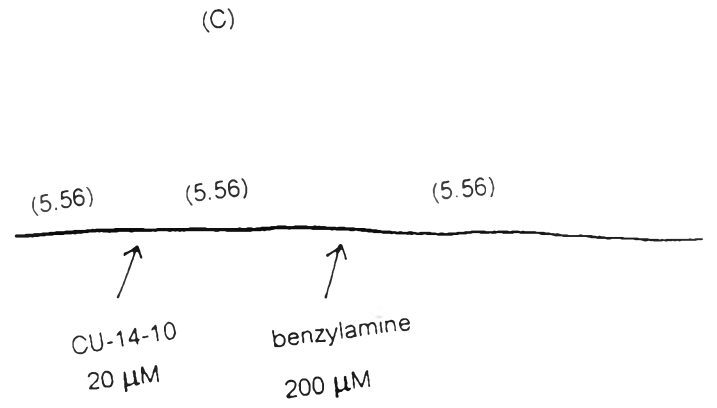
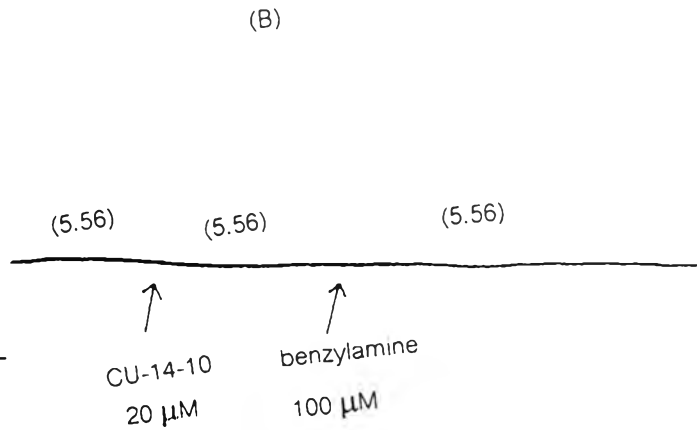
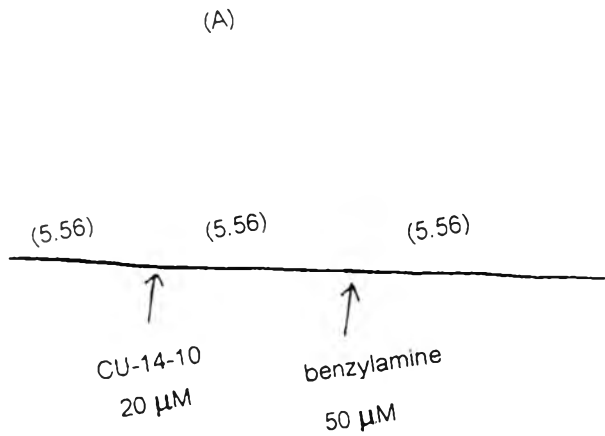


รูปที่ 79 Double-reciprocal plot แสดง kinetics inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM เมื่อใช้ 5-hydroxytryptamine (preferred substrate for MAO-A) เป็นสับสเตรท ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (โดยกรณีของ control $y = 0.0066X + 0.0467$; $R^2 = 0.9887$, กรณีของ CU 763-14-10 (5 μM) $y = 0.0144X + 0.0335$; $R^2 = 0.9701$, กรณีของ CU 763-14-10 (10 μM) $y = 0.0235X + 0.0161$; $R^2 = 0.9844$ และกรณีของ CU 763-14-10 (20 μM) $y = 0.0213X + 0.1562$; $R^2 = 0.9998$)

รูปที่ 80 Oxygraph tracings แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ขนาด 20 μM เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B)

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , ไมโตคอนเดรีย 3.17 มก.โปรตีน/มล. ส่วนประกอบอื่นที่เติมตามลงไปอีกดังแสดงในรูป คือ CU 763-14-10 ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO และ benzylamine ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C

ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนมีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที



ตารางที่ 15

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

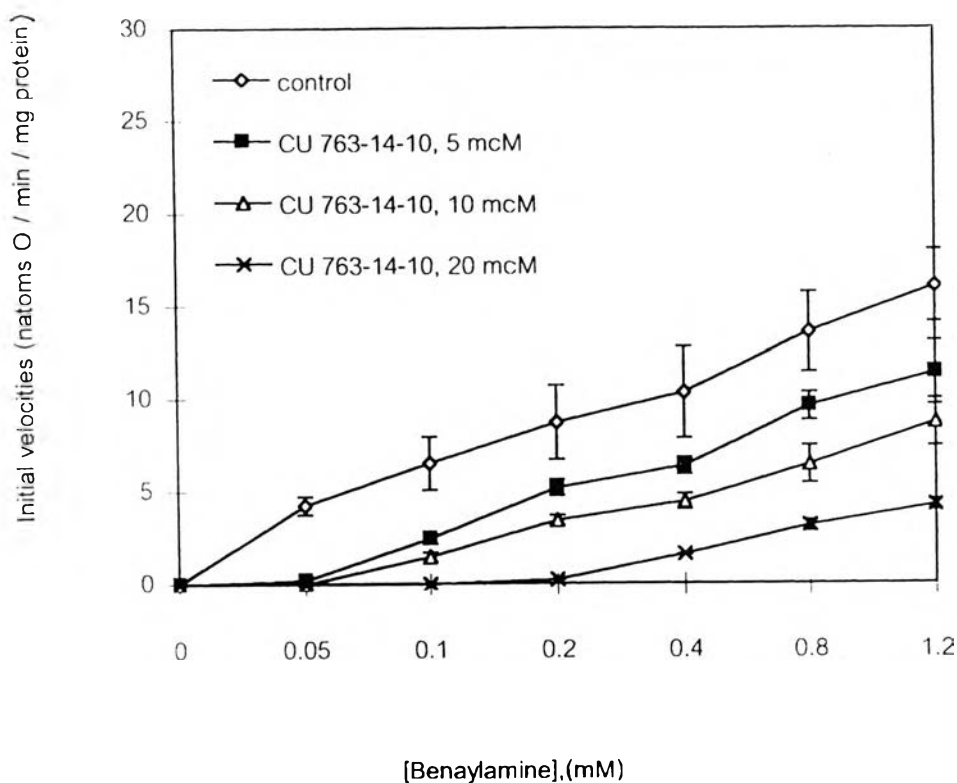
Benzylamine (mM)	Initial velocities (natoms O / min / mg protein)				
	Control	DMSO (10 μl)	CU 763-14-10 (5 μM)	CU 763-14-10 (10 μM)	CU 763-14-10 (20 μM)
0.05	6.71 \pm 0.43	6.71 \pm 0.43	0.21 \pm 0.21*	0.00 \pm 0.00*	0.00 \pm 0.00*
0.10	12.05 \pm 0.63	12.05 \pm 0.63	2.45 \pm 0.26	1.46 \pm 0.27* [☆]	0.00 \pm 0.00* ^{☆♣}
0.20	15.70 \pm 1.18	15.70 \pm 1.18	5.21 \pm 0.45	3.44 \pm 0.27* [☆]	0.25 \pm 0.25* ^{☆♣}
0.40	19.14 \pm 0.93	19.14 \pm 0.93	6.40 \pm 0.47	4.47 \pm 0.43* [☆]	1.61 \pm 0.28* ^{☆♣}
0.80	20.71 \pm 1.19	20.71 \pm 1.19	9.63 \pm 0.75	6.49 \pm 1.02 [☆]	3.16 \pm 0.38* ^{☆♣}
1.20	22.67 \pm 1.84	22.67 \pm 1.84	11.42 \pm 1.71	8.73 \pm 1.28 [☆]	4.25 \pm 0.45* [☆]

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

☆ แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-14-10 (5 μM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

♣ แตกต่างจากกลุ่ม CU 763-14-10 (10 μM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

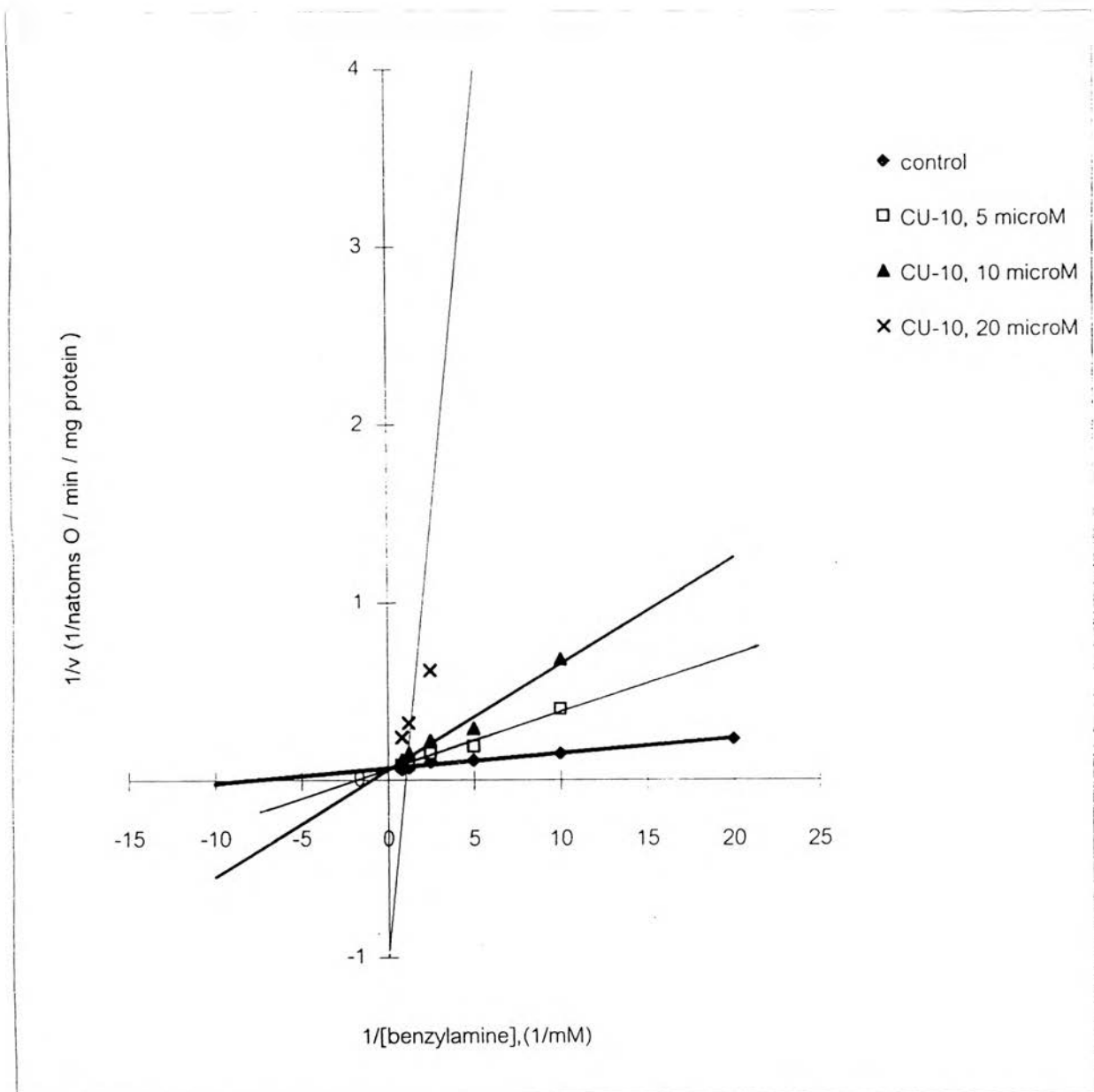
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , benzylamine 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 และ 1.20 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.09 (กรณีของ control), 2.84 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 5 μM), 2.84 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 10 μM) และ 2.60 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 20 μM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

รูปที่ 81 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วต้น (initial velocities, v) ของ MAO ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว กับความเข้มข้นของ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) ในภาวะปกติ (control) และเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา : sodium phosphate buffer, pH 7.4 (sodium phosphate dibasic 3.30 mM, sodium phosphate monobasic 2.34 mM), sucrose 13.02 mM, rotenone 10 μg , benzylamine 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 และ 1.20 μM และไมโตคอนเดรียเฉลี่ย 3.09 (กรณีของ control), 2.84 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 5 μM), 2.84 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 10 μM) และ 2.60 (กรณีที่ใช้ CU 763-14-10 = 20 μM) มก.โปรตีน/มล. ปริมาตรทั้งหมด 1.92 มล. อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 82 Double-reciprocal plot แสดง kinetics inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวโดย CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 μM เมื่อใช้ benzylamine (preferred substrate for MAO-B) เป็นสับสเตรท ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง (โดยกรณีของ control $y = 0.0084X + 0.0646$; $R^2 = 0.9802$, กรณีของ CU 763-14-10 (5 μM) $y = 0.2322X - 0.585$; $R^2 = 0.8384$, กรณีของ CU 763-14-10 (10 μM) $y = 0.0598X + 0.0557$; $R^2 = 0.9737$ และกรณีของ CU 763-14-10 (20 μM) $y = 0.9648X - 0.9733$; $R^2 = 0.9199$)

ตารางที่ 16

แสดงค่า Michaelis constants (Km) ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ในสภาวะปกติ (control) เปรียบเทียบกับเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 และ CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

Compound	K _m (μM)		
	Tyramine (Both types)	5-Hydroxytryptamine (MAO-A)	Benzylamine (MAO-B)
Control	150.07 \pm 15.20	334.93 \pm 188.84	168.08 \pm 36.04
CU 763-10-01 (500 μM)	476.87 \pm 157.52	269.61 \pm 28.69	817.35 \pm 564.01
CU 763-10-01 (1,000 μM)	919.35 \pm 268.79	648.07 \pm 91.11*	329.48 \pm 55.67
CU 763-14-10 (5 μM)	214.96 \pm 27.46	169.62 \pm 65.25	724.73 \pm 236.93
CU 763-14-10 (10 μM)	476.69 \pm 203.88	762.26 \pm 235.23	1,001.31 \pm 295.04
CU 763-14-10 (20 μM)	262.55 \pm 86.66	312.91 \pm 36.04	2,113.99 \pm 519.12

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 17

แสดงค่าความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว ในสภาวะปกติ (control) เปรียบเทียบกับเมื่อถูกยับยั้งด้วย CU 763-10-01 และ CU 763-14-10 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

Compound	V_{max} (natoms O / min / mg protein)		
	Tyramine (Both types)	5-Hydroxytryptamine (MAO-A)	Benzylamine (MAO-B)
Control	28.15 \pm 15.20	37.45 \pm 18.68	17.13 \pm 2.89
CU 763-10-01 (500 μ M)	19.64 \pm 157.51*	13.63 \pm 1.78	12.00 \pm 1.43
CU 763-10-01 (1,000 μ M)	30.82 \pm 268.79	11.68 \pm 4.33	12.75 \pm 4.49
CU 763-14-10 (5 μ M)	34.94 \pm 27.46	15.80 \pm 3.93	19.42 \pm 4.11
CU 763-14-10 (10 μ M)	23.99 \pm 203.88	31.09 \pm 7.99	16.37 \pm 2.44
CU 763-14-10 (20 μ M)	12.05 \pm 86.66 *	9.47 \pm 0.87	8.26 \pm 5.60

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$