บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

2.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาว (Rat) พันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 180-220 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป

2.2 เครื่องมือ

2.2.1 Heidolph homoginizer (Type S0203 RZR 2)

2.2.2 Hitachi high speed refrigerated centrifuge Himac SCR 20 B, Rotor model RPR-18-3

2.2.3 Clark's oxygen electrode

2.2.4 Oxygen monitor (YSI model 5300)

2.2.5 Strip chart recorder (Gilson model N2)

2.2.6 Spectrophotometer (Ultrospec II)

2.2.7 pH meter

2.3 สารเคมี

2.3.1 CU 763-10-01, CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.2 สับสเตรทสำหรับเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical

- 5-hydroxytryptamine creatinine sulphate complex สำหรับ MAO-A
- benzylamine hydrochloride สำหรับ MAO-B
- tyramine hydrochloride สำหรับเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสทั้งสองชนิด

2.3.3 Irreversible inhibitor ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical

- clorgyline hydrochloride สำหรับ MAO-A
- selegiline hydrochloride สำหรับ MAO-B
- pargyline hydrochloride สำหรับเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสทั้งสองชนิด

2.3.4 สารเคมีอื่นๆ ที่ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical

- Bovine serum albumin
- Cupric sulphate
- Dimethy sulfoxide(DMSO)
- Ethyleneglycol-bis-(β-aminocethyl ether) N,N,N′N′-tetraacetic acid (EGTA)
- Folin & Ciocalteu 's phenol reagent
- Potassium hydroxide
- Rotenone
- Sodium phosphate monobasic
- Sodium phosphate dibasic
- Sodium potassium tartate
- Sucrose

2.3.5 สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท E.Merck, Darmstadt

- Hydrochloric acid
- Sodium carbonate

2.4 การเตรียมสารเคมี

Isolated medium

-0.25 M sucrose + 1 mM EGTA

sucrose 42.7875 กรัม นำมาละลายน้ำกลั่น เติม stock solution ของ 0.25 EGTA 2 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.2 ด้วยสารละลาย 1 N hydrochloric acid และ 0.3 N potassium hydroxide จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

-0.25 M sucrose

sucrose 42.7875 กรัม นำมาละลายน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.2 ด้วยสารละลาย 1 N hydrochloric acid และ 0.3 N potassium hydroxide จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

- 0.25 M EGTA stock solution

EGTA 4.755 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ใช้ potassium hydroxide ช่วยในการละลาย ปรับ pH ของสารละลายเป็น 7.2 ด้วยสารละลาย 1 N hydrochloric acid และ 0.3 N potassium hydroxide จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

Sodium phosphate buffer, pH 7.4 (incubation medium)

sodium phosphate monobasic 0.0300 กรัม และ sodium phosphate dibasic 0.0500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น นำมาผสมรวมกัน แล้วปรับ pH ของสารละลายเป็น 7.4 ด้วยสารละลาย 1 N hydrochloric acid และ 0.3 N potassium hydroxide จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมใช้ให้หมดในการทดลองแต่ละครั้ง

สารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

- Alkaline copper reagent ประกอบด้วย 0.5% copper sulphate ในสารละลาย 1% w/v potassium tartrate และ 10% sodium carbonate ในสารละลาย 0.5 N sodium hydroxide ในอัตราส่วน 1: 10 v/v

การเตรียมจะเตรียมเป็น stock solution ของ 1% copper sulphate, 2% potassium tartrate, 20% sodium carbonate และ 1 N sodium hydroxide เมื่อจะใช้จึงนำสารละลายที่ได้จากการผสม 1% copper sulphate 1 มิลลิลิตร กับ 2% potassium tartrate 1 มิลลิลิตร มาผสมรวมเข้ากับสารละลายที่ได้จากการผสม 20% sodium carbonate 10 มิลลิลิตร กับ 1 N sodium hydroxide 10 มิลลิลิตร

- Folin phenol reagent

เตรียมได้จากการเจือจาง Folin & Ciocalteu' s phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1/10 v/v ซึ่งต้องเตรียมใช้ทันที

CU 763-10-01 และ CU 763-14-07 รวมทั้งสารเคมีส่วนใหญ่ละลายด้วยน้ำกลั่นสามครั้ง (distilled water) ส่วน CU 763-14-10 และ rotenone จะละลายด้วย DMSO ปรับ pH ด้วยสารละลาย potassium hydroxide และ hydrochloric acid เก็บไว้ในตู้เย็น

2.5 การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

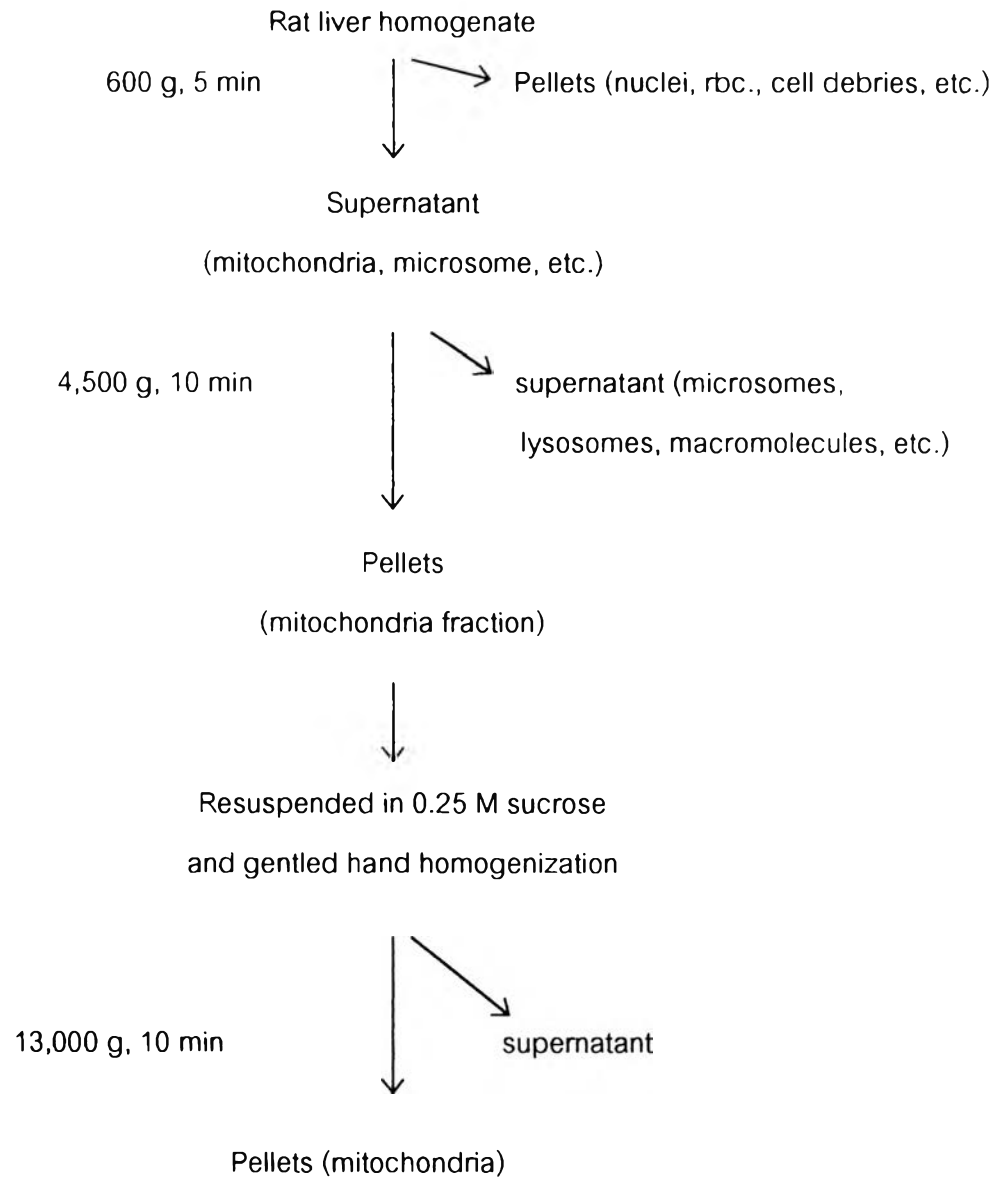
เตรียมโดยใช้วิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myers และ Slater (1957) เป็นผู้บรรยายและดัดแปลงเพียงเล็กน้อย ในการทำวิจัยนี้จะใช้ไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาวเป็นแหล่งของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ฝังตัวอยู่ที่ผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย โดยขั้นตอนการเตรียมแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

การเตรียมโดยทำให้หนูตายทันทีด้วยการทำ cervical dislocation ผ่าผนังหน้าท้องแล้วรีบตัดแยกตับมาล้างด้วย isolation medium ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) ที่เย็นจัดประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆด้วยกรรไกร ล้างด้วย medium จนหมดเลือด แล้วเติม medium ลงไปประมาณ 60-70 มล. นำไป homogenize ด้วย Heidolph homogenizer type 50203 RZR 2 ในขั้นตอนนี้จะได้ liver homogenate ประมาณ 60-70 มล. ซึ่งตลอดเวลาการเตรียมตับและไมโตคอนเดรียจะแช่อยู่ใน medium ที่บรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice-cold) ให้เย็นอยู่ตลอดเวลา

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาปั่นแยกตามหลัก differential centrifugation โดยเครื่อง Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac Model CR 20B 3 โดยใช้ rotor model RPR-18-3 ตั้งอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการปั่นแยกทั้งหมดสามครั้งด้วยความเร็ว 600 g, 4,500 g และ 13,000 g ตามลำดับ ดังแผนภาพในรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงขั้นตอนการปั่นแยกไมโตคอนเดรีย จาก rat liver homogenate โดย differential centrifugation

จากรูป pellets ที่ได้จากการปั่นครั้งสุดท้ายจะเห็นแยกเป็นสองชั้นอย่างชัดเจน ชั้นบนเป็นสีชมพูเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ คือชั้นของไมโครโซม ส่วนชั้นล่างมีสีน้ำตาลเกาะกันแน่นกว่า คือชั้นของไมโตคอนเดรีย รินส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไปและล้างส่วนของไมโครโซมออกให้หมดด้วย 0.25 M sucrose จนเหลือแต่ส่วนของไมโตคอนเดรีย แล้ว resuspended อีกครั้งด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 มล. บดเบาๆด้วยมือใน glass homogenizer จะได้ mitochondria suspension เพื่อใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียคิดเป็นปริมาณโปรตีน 30-60 มก./มล. ไมโตคอนเดรียที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วัน ก่อนนำมาวัดสมรรถนะของเอนไซม์ เมื่อจะใช้จึงนำไปทำให้ละลายและแช่ไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลาที่ทำการทดลอง

2.6 การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากสมรรถนะของเอนไซม์ในการทดลองแต่ละครั้งขึ้นกับปริมาณหรือความเข้มข้นของเอนไซม์ จึงจำเป็นต้องหาปริมาณหรือความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง ในหน่วยของโปรตีนเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) โดยมีหลักการคือให้โปรตีนในไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับ copper sulphate ($CuSO_4$) ในสารละลายด่าง เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultraspec II) นำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ที่ใช้ bovine serum albumin (BSA) ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าความเข้มข้นของตัวอย่างเป็นโปรตีนมาตรฐาน

ขั้นตอนการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียมีดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:300)

2. นำไมโตคอนเดรียที่เจือจางแล้วจากข้อ1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที ในกรณี blank ใช้น้ำกลั่นแทนไมโตคอนเดรีย ส่วน standard curve ใช้ bovine serum albumin ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแทน

3. เติม Folin phenol reagent ที่เจือจางแล้วปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ใน water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีน standard curve ของ BSA แล้วคูณด้วย dilution factor 300 จะได้ปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.7 การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดยใช้อัตราการใช้ออกซิเจน

- หลักการและเครื่องมือ

เนื่องจากโมโนเอมีนออกซิเดสจะออกซิไดซ์สารเอมีนโดยกระบวนการ oxidative deamination ต้องใช้ออกซิเจนในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ (Creasey, 1995)

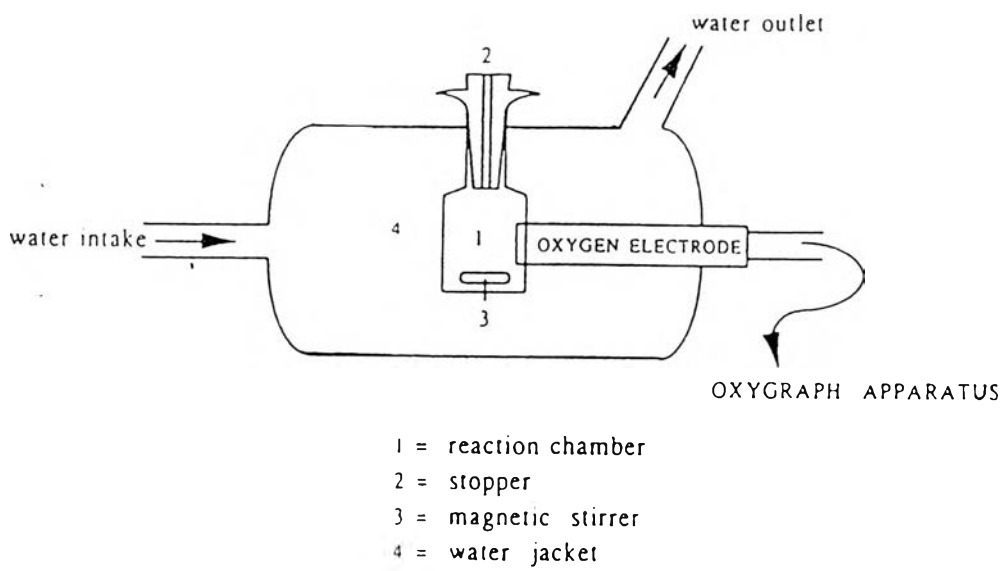
$$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + H_2O + O_2 \rightleftharpoons R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$$

การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ด้วยการวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยานี้เป็น direct continuous method (Tipton and Dawson, 1968) ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถวัดสมรรถนะของเอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่อง ถึงแม้มีข้อจำกัดอยู่บ้าง เนื่องจากอัตราการออกซิเจนอาจถูกรบกวนโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอื่นๆ ในกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย แต่สามารถแก้ไขได้โดยใช้ respiratory chain inhibitors ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ rotenone เป็นตัวยับยั้ง

ในการทำวิจัยนี้จะวัดปริมาณการใช้ออกซิเจนในการทำปฏิกิริยา โดยวิธีที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือประกอบด้วยส่วนที่สำคัญคือ Gilson reaction chamber (รูปที่ 15) ซึ่งมีความจุประมาณ 2 มิลลิลิตร ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ระหว่างชั้นมีช่องทางให้น้ำเข้าและออก (water jacket) ต่ออยู่กับ water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายในมี magnetic stirrer ขนาดเล็กช่วยหมุนกวน ส่วนประกอบของปฏิกิริยา (reaction mixture) ให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวตลอดเวลา ด้านบนมีฝาจุก (stopper) สำหรับเปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูขนาดเล็กมากสำหรับให้เข็ม microsyringe สอดลงไป เพื่อเติมสารต่างๆลงไปทำปฏิกิริยา ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนขณะทำการวัด ด้านข้างของ chamber

จะมี oxygen electrode (Clark type) เป็นตัววัดปริมาณออกซิเจนแล้วส่งข้อมูลมาที่ biological oxygen monitor (YSI model 5300) ซึ่งจะแสดงผลออกมาทางหน้าปัดของเครื่องเป็นตัวเลขและบันทึกผลลงบนกระดาษกราฟที่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ โดยต่อ output เข้ากับเครื่อง Kipp and Zonen recorder (single channel BD 111) ได้เป็น oxygen-electrode tracing (หรือ polarographic tracing, oxygraph tracing)

การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส เริ่มด้วยการเติม mitochondrial suspension ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป incubate กับ medium (phosphate buffer, pH 7.4) ปริมาตร 1.80 มิลลิลิตร พร้อมกับ rotenone และ selective inhibitor ในบางการทดลอง ใน Gilson reaction chamber ปิดจุกเพื่อเริ่มวัดปริมาณออกซิเจนภายใน จากนั้นเติมสารที่เราต้องการทดสอบและสับสเตรทของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสลงไปทำปฏิกิริยา ปริมาณออกซิเจนจะค่อยๆลดลง โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจนในช่วงแรก แสดงถึงความเร็วต้น (initial velocity, v) ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์สับสเตรท



รูปที่ 15 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ด้านข้างมี oxygen electrode ติดตามการใช้ออกซิเจนในการทำปฏิกิริยาแสดงผลได้โดยต่อเข้ากับ oxygen apparatus (oxygen monitor และ recorder)

-การคำนวณหาสมรรถนะของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

ในการวิจัยนี้จะใช้ความเร็วต้นเป็นตัวบอกถึงสมรรถนะของเอนไซม์ การหาความเร็วต้นของเอนไซม์ก็คือ การหาผลต่างของอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนและหลังการเติมสับสเตรทในช่วงแรกที่มีการลดลงของปริมาณออกซิเจน (จากการลากเส้นสัมผัส) การคำนวณดูรูปที่ 16 ประกอบ

อัตราการใช้ออกซิเจนก่อนเติมสับสเตรท (X) = Q x S/P นนอ.ออกซิเจน / นาที .....(1)

อัตราการใช้ออกซิเจนหลังเติมสับสเตรท (Y) = R x S/P นนอ.ออกซิเจน / นาที .....(2)

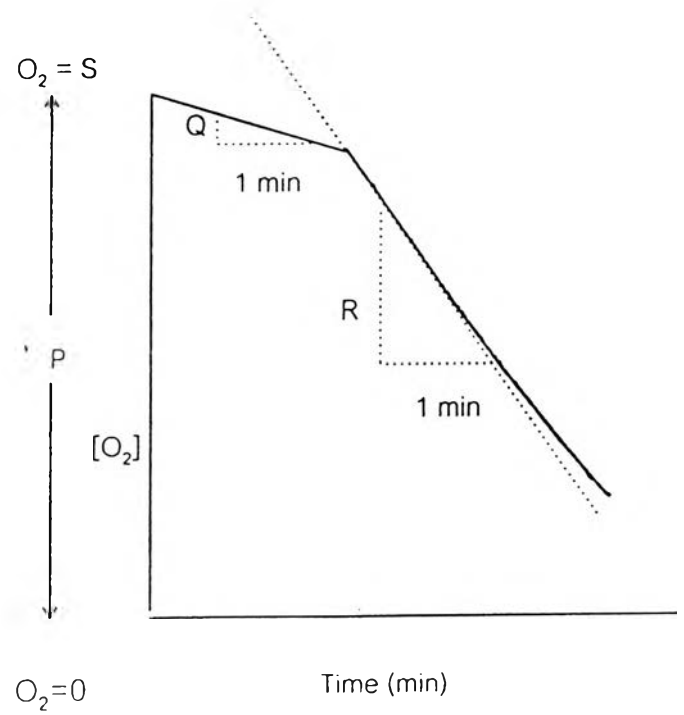
อัตราการใช้ออกซิเจนในปฏิกิริยา = Y-X นนอ.ออกซิเจน / นาที .....(3)

โดยที่ P = ความสูงของเส้น P ในรูป

Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป

R = ความสูงของเส้น R ในรูป

S = จำนวนนนอ.ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกใช้ไปในปฏิกิริยา



รูปที่ 16 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาความเร็วต้น (initial velocity,v) ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสโดย polarographic method

ค่า s นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของส่วนประกอบของปฏิกิริยาที่อยู่ใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง กล่าวคือ ถ้ามีปริมาตรมากออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มาก ส่วนอุณหภูมิสูงออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้น้อยกว่าเมื่ออุณหภูมิต่ำ ซึ่งสามารถคำนวณหาได้จากสมการ

$$A = s \times P \times N \times 10^{9} / V \times 100$$ นนอ.ออกซิเจน / มล .....(4)

เมื่อ A = จำนวน นนอ.ออกซิเจน ที่ละลายในน้ำ 1 มล.

s = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 มม.ปรอท แล้วถูกดูดซึมในน้ำ 1 หน่วยปริมาตร เมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 10 มม.ปรอท) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37°C

P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ (21%)

N = จำนวนอะตอม 1 โมเลกุลของออกซิเจนซึ่งเท่ากับ 2

V = ปริมาตรของก๊าซที่ 0°C ความดันบรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 มล.

คำนวณแล้วจะได้ค่าปริมาตร ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล. (A) ที่อุณหภูมิ 37°C มีค่าเท่ากับ 444.9 นนอ.ออกซิเจน / มล. เมื่อต้องการทราบค่า S ต้องนำปริมาตรของ reaction mixture มาคูณ เช่น ปริมาตรของ reaction mixture = 1.92 มล.

$$S = A \times 1.92$$ นนอ.ออกซิเจน..... .....(5)

นำค่า S ที่ได้ไปแทนค่าในสมการที่ (1) และ (2) อัตราการใช้ออกซิเจนในปฏิกิริยา คือความเร็วต้นของเอนไซม์ มีหน่วยเป็น นาโนอะตอมออกซิเจน / นาที (natoms O/min) ต้องนำมาหารปริมาณโปรตีนใน reaction mixture จึงจะได้ความเร็วต้นของเอนไซม์มีหน่วยเป็น นนอ.ออกซิเจน /นาที/ มิลลิกรัมโปรตีน (natoms O / min / mg protein)

2.8 วิธีดำเนินการวิจัย

2.8.1 ศึกษาเปรียบเทียบผลของ CU 763-10-01 กับ CU 763-14-07 และ CU 763-14-10 ต่อกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาวในขนาดต่างๆ

2.8.2 ศึกษาความแรง (potency) และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ในการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

-หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (Dose-response relationship) เปรียบเทียบกันระหว่าง CU 763-10-01 ในช่วงความเข้มข้น 10^{-6} ถึง 10^{-3} M กับ CU 763-14-10 ในช่วงความเข้มข้น 10^{-9} ถึง 10^{-4} M โดยใช้ tyramine, benzylamine และ 5-hydroxytryptamine ความเข้มข้นคงที่ 0.10 mM เป็นสับสเตรท เพื่อเปรียบเทียบความแรงและความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์

-เปรียบเทียบความแรงในการยับยั้งเอนไซม์กับ irreversible inhibitors ได้แก่ pargyline (nonselective MAO inhibitor), selegiline (selective MAO-B inhibitor) และ clorgyline (selective MAO-A inhibitor) โดยใช้ tyramine, benzylamine และ 5-hydroxytryptamine ความเข้มข้นคงที่ 0.10 mM เป็นสับสเตรท

2.8.3 ศึกษา kinetic inhibition เพื่อดูลักษณะของการยับยั้งเอนไซม์ว่าเป็น competitive, non competitive หรือ mixed inhibition จาก double-reciprocal plots พร้อมทั้งเปรียบเทียบค่า Michaelis parameters

- ศึกษา kinetic inhibition ของ MAO-A เมื่อให้ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 หรือ CU 763-14-10 คงที่ในขนาดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยใช้ 5-hydroxytryptamine ความเข้มข้น0.025, 0.050, 0.100, 0.25 และ0.500 mM เป็นสับสเตรท

- ศึกษา kinetic inhibition ของ MAO-B เมื่อให้ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 หรือ CU 763-14-10 คงที่ในขนาดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยใช้ benzylamine ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.40,0.80 และ 1.20 mM เป็นสับสเตรท

- ศึกษา kinetic inhibition ของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสชนิดไม่จำเพาะเจาะจง เมื่อให้ความเข้มข้นของ CU 763-10-01 หรือ CU 763-14-10 คงที่ในขนาดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยใช้ tyramine ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.40,0.80 และ 1.20 mM เป็นสับสเตรท

2.9 การแสดงผลการทดลอง

- Oxygraph tracings ลอกจากกระดาษกราฟจริงซึ่งเคลื่อนที่ด้วยความเร็ว 0.2 มิลลิเมตร / วินาที ที่แสดงในวงเล็บคืออัตราการใช้ออกซิเจน มีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน / มิลลิลิตร / นาที

- ตารางและกราฟแสดงค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

- Double-reciprocal plots ระหว่างส่วนกลับของความเร็วต้น (1/v) และส่วนกลับของความเข้มข้นของสับสเตรท (1/s) เพื่อศึกษา inhibition kinetics

2.10 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

- ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดย unpaired student's t-test

- ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความเร็วต้น (1/v) และส่วนกลับของความเข้มข้นของสับสเตรท (1/s) โดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression) $y = a + bx$