

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบการระงับปวดในหนูทดลอง

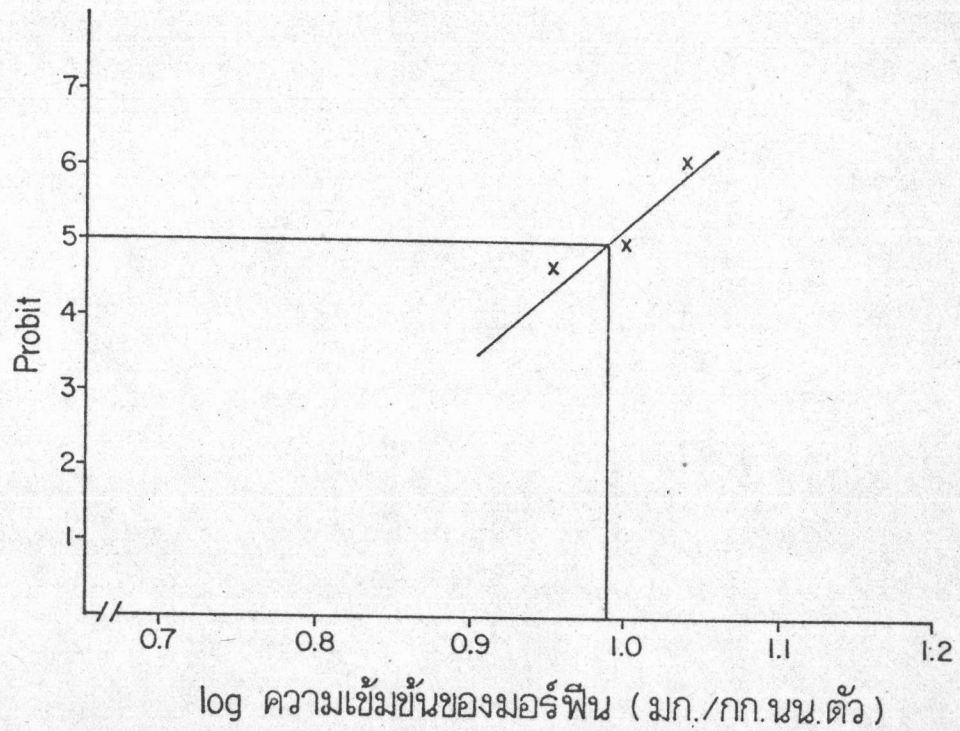
จากการใช้หนูตัวผู้อายุ 3-4 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 300 กรัม (280-320 กรัม) จำนวน 20 ตัว มาทดสอบการระงับปวดโดยจับเวลาการตอบสนองของหางหนู เมื่อจุ่มหางในน้ำร้อน 58 ± 1 องศาเซลเซียส พบว่าค่าเฉลี่ยของการกระดิกของหางหนูขึ้นจากน้ำเป็น 1.4 ± 0.47 วินาที ซึ่งแตกต่างจากเวลา 10 วินาที (เวลาที่มีการระงับปวดสมบูรณ์) อย่างมีนัยสำคัญ ในการทดลอง จะทำการทดสอบ 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 นาที

4.2 ผลการพัฒนาค่าการดื้อยาของมอร์ฟีนของหนูอย่างมีระบบด้วยค่า AD_{50}

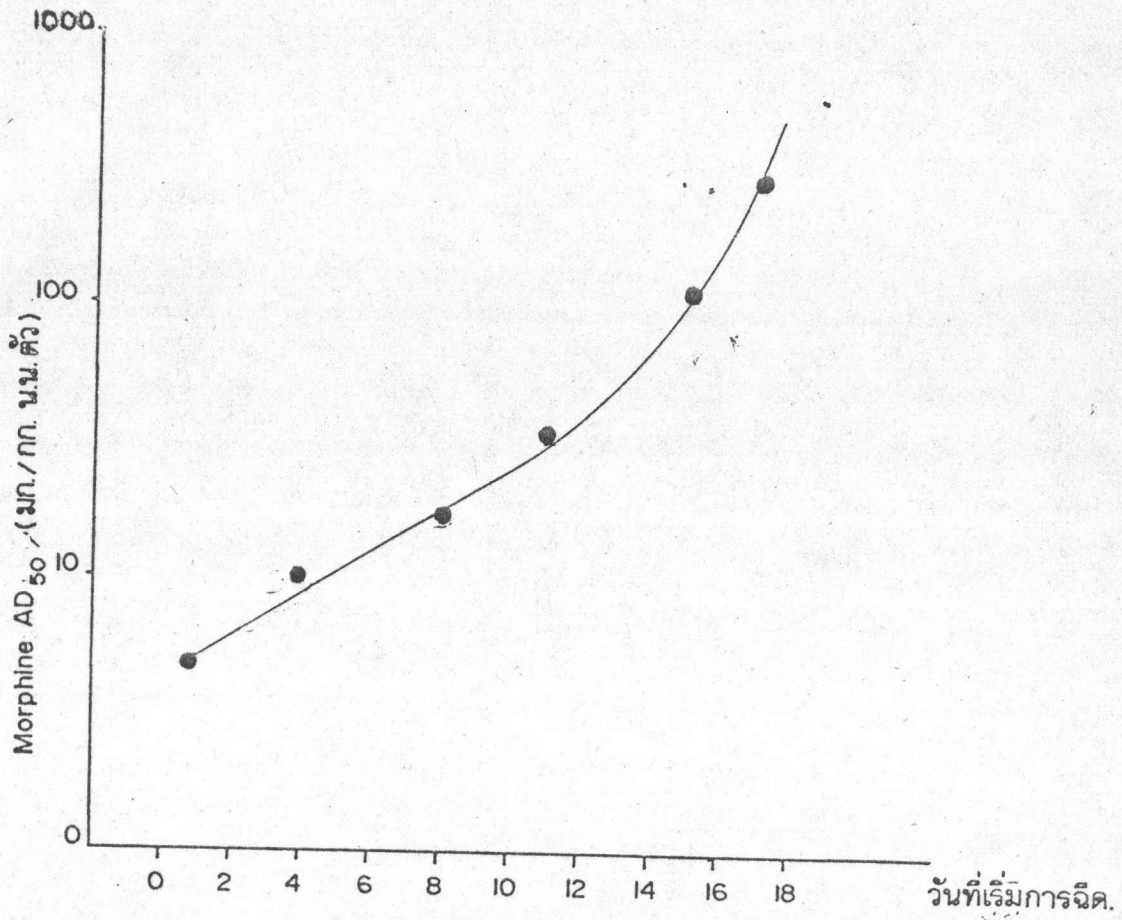
เมื่อใช้หนูทดลอง 6 กลุ่ม ๆ ละ 24 ตัว มาพัฒนาค่าการดื้อยาของมอร์ฟีน โดยการฉีดมอร์ฟีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เข้าหนูทดลองทุกตัว เข้าเย็นจนครบ 3 วัน เมื่อทำการวัดการตอบสนองต่อความปวดของหางหนูพบว่าหนูทุกตัวให้ค่าเวลาการระงับปวดเท่ากับหนูปกติ เมื่อนำหนูกลุ่มแรกไปหาค่า AD_{50} ตามวิธีข้อ 3.5 โดยฉีดมอร์ฟีนความเข้มข้น 9, 10 และ 11 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าค่า AD_{50} ซึ่งอ่านได้จากกราฟมีค่า 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากนั้นฉีดมอร์ฟีนซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ให้หนูกลุ่มที่ 2 ถึง 6 จนครบ 4 วัน และทดสอบการตอบสนองของหางหนูทุกตัว พบว่าให้ค่าเวลาของการระงับปวดเท่ากับหนูปกติ นำหนูกลุ่มที่ 2 มาหาค่า AD_{50} โดยฉีดมอร์ฟีนความเข้มข้น 16, 18 และ 19.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ได้ค่า AD_{50} เท่ากับ 17 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และเมื่อนำมอร์ฟีนความเข้มข้น 17 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไปฉีดให้หนูกลุ่มที่ 3 ถึง 6 ต่ออีก 3 วัน หาค่า AD_{50} ในหนูกลุ่มที่ 3 โดยใช้มอร์ฟีน 31, 33 และ 35 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ได้ AD_{50} 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และเมื่อทำการทดลองพัฒนาค่าการดื้อยา และวัดค่า AD_{50} ในหนูคือยาในกลุ่มที่เหลือ (กลุ่มที่ 5 และ 6) โดยวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่าสามารถพัฒนาค่าการดื้อยาในหนูกลุ่มที่เหลือให้มีการดื้อยาของมอร์ฟีนความเข้มข้น 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ ตารางที่ 3 และรูปที่ 5 แสดงตัวอย่างวิธีคำนวณค่าของสภาวะการดื้อยาหลังจากฉีดหนูทดลองด้วยมอร์ฟีนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นาน 3 วัน รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ฉีดกับวันที่ฉีดในลักษณะของกราฟแท่ง เมื่อนำค่าเหล่านี้ไปเขียนกราฟแบบ semi-log (รูปที่ 7) จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของมอร์ฟีนต่ำ ๆ (5, 9.8, 17 และ 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) การเพิ่มองศาการดื้อยาในระยะต้นจะมีค่าคงที่ หลังจากนั้น เมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนสูงขึ้น (112 กับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) ความสามารถในการพัฒนาค่าการดื้อยาของหนู จะเพิ่มเร็วขึ้นกว่าช่วงแรก

ตารางที่ 3 ตัวอย่างแสดงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาค่า AD_{50} 9.8 มก./กก.นน.ตัว

ความเข้มข้นของ มอร์ฟีน มก./กก.นน.ตัว	จำนวนหนู	% ของหนูที่ เกิด complete analgesia	Probit	log ความเข้มข้น ของมอร์ฟีน	AD_{50} มก./กก.นน. ตัว
9	8	37.5	4.68	0.95	9.8
10	8	50.0	5.00	1.0	
11	8	85.7	6.07	1.04	



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า probit กับ log ความเข้มข้นของมอร์ฟีน ซึ่งใช้ในการหาค่า AD_{50}



รูปที่ 7

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า morphine AD₅₀ กับวันที่เริ่มการฉีด
บนกระดาษกราฟ semi-log. เมื่อพัฒนาให้หนูต้อยาโดยวิธีของ เสาวณีชัย
กาญจนรุ่งพล 1979

4.3 ผลการศึกษาภาวะพึ่งยาทางกาย (Physical dependence) ในหนูติด ยามอร์ฟิน

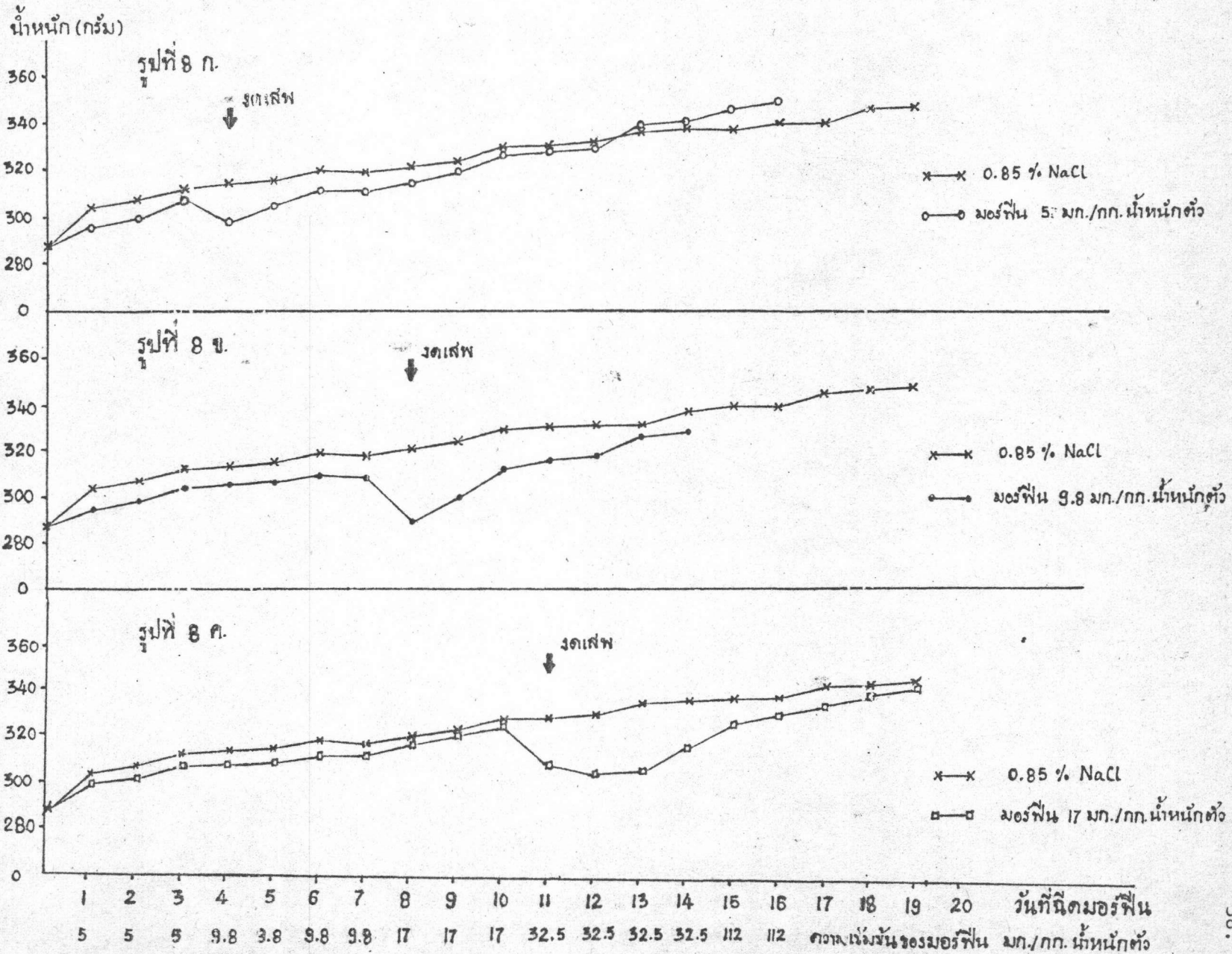
ได้ศึกษาภาวะพึ่งยาทางกายของหนูติดยามอร์ฟิน โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักหนูทดลองเพศผู้หลังจากทำให้หนูติดยามอร์ฟินความเข้มข้นต่าง ๆ จากการติดตามชั่งน้ำหนักหนูทุกวันตั้งแต่เริ่มให้มอร์ฟินและหลังจากงดเสพแล้วต่ออีก 10 วัน ผลการทดลองดังรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าในขณะที่หนูมีการพัฒนาการติดยาเพิ่มขึ้น จะมีการเพิ่มน้ำหนักของหนูแต่ละกลุ่มในรูปแบบเดียวกับหนูปกติ และหลังจากให้หนูซึ่งติดยาเหล่านี้งดเสพยามอร์ฟิน จะเห็นได้ว่าหนูซึ่งติดยามอร์ฟิน 5, 9.8, 17, 32.5 และ 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว มีน้ำหนักลดลงหลังจากงดเสพวันแรก 3.4, 5.9, 5.6, 6.2 และ 7.9% ตามลำดับ แต่ในหนูติดยามอร์ฟินความเข้มข้น 17, 32.5 และ 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว น้ำหนักจะยังคงลดในวันที่ 2 6.8, 8.6 และ 12.5% ตามลำดับ สำหรับหนูติดยามอร์ฟิน 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักยังคงลดถึงวันที่ 3 ซึ่งเมื่อคิดรวมแล้วจะมีการลดของน้ำหนัก หลังจากงดเสพถึง 12.7% ดังกราฟ รูปที่ 9 หลังจากนั้นน้ำหนักหนูจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นกระทั่งรูปแบบเหมือนกับหนูปกติ

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟินโดยวิธีราดิโออิมมูโนแอสเสย์

4.4.1 ผลการศึกษาวิธีวัดปริมาณมอร์ฟินในสมองหนู

จากการศึกษากราฟมาตรฐานของวิธีวัดปริมาณมอร์ฟิน โดยละลายมอร์ฟินความเข้มข้น 0-40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ของบริษัท Roche และละลายใน 0.01 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน pH 7.4 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 11 ค่าร้อยละของการรวมตัวระหว่างมอร์ฟินติดฉลากและแอนติบอดีของมอร์ฟินที่ความเข้มข้น 0.125 และ 4 นาโนกรัม ต่อก่อนทดลอง ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน 38% และในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ต่างกัน 41% โดยที่ลักษณะกราฟทั้ง 2 เส้นเกือบจะขนานกัน

ในการวัดปริมาณมอร์ฟินในสมอง ใช้กราฟมาตรฐานซึ่งมีมอร์ฟินมาตรฐานละลายอยู่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน แต่เนื่องจากมอร์ฟินที่สกัดจากสมองอยู่ในสารละลายกรดเกลือ 0.01 นอร์มอล ดังนั้นจึงต้องใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ความเข้มข้น สูงพอที่จะปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลาง ดังนั้นจึงได้ศึกษาอิทธิพลของกำลังแรงไอออน (Ionic strength) ต่อกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมอร์ฟินมาตรฐานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน pH 7.4 และมีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ผลจากกราฟรูปที่ 12 แสดงให้เห็นว่า ลักษณะของกราฟมาตรฐานของมอร์ฟินเมื่อละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 โมลาร์ ไม่มีความแตกต่างกัน



น้ำ (กรัม)

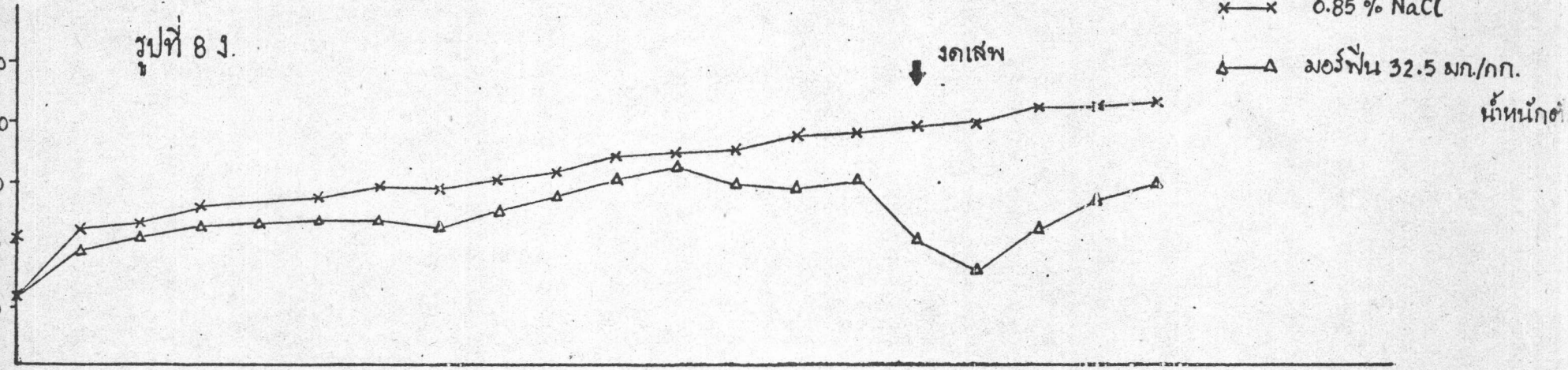
รูปที่ 8 ง.

x-x 0.85 % NaCl

△-△ มอร์ฟีน 32.5 มก./กก.

น้ำหนักตัว

↓ งดเสฟ



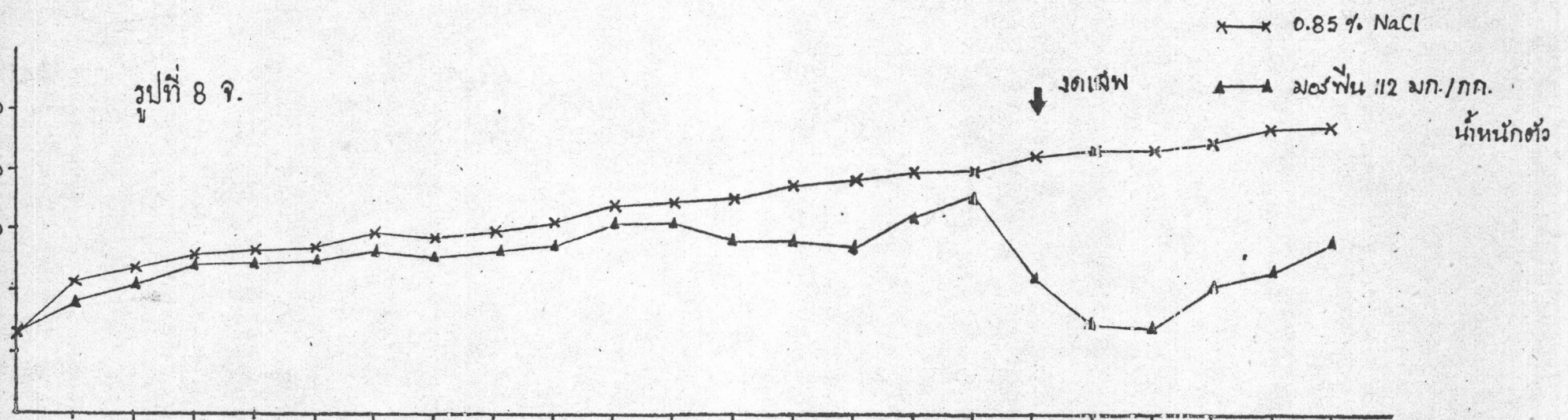
รูปที่ 8 จ.

x-x 0.85 % NaCl

△-△ มอร์ฟีน 112 มก./กก.

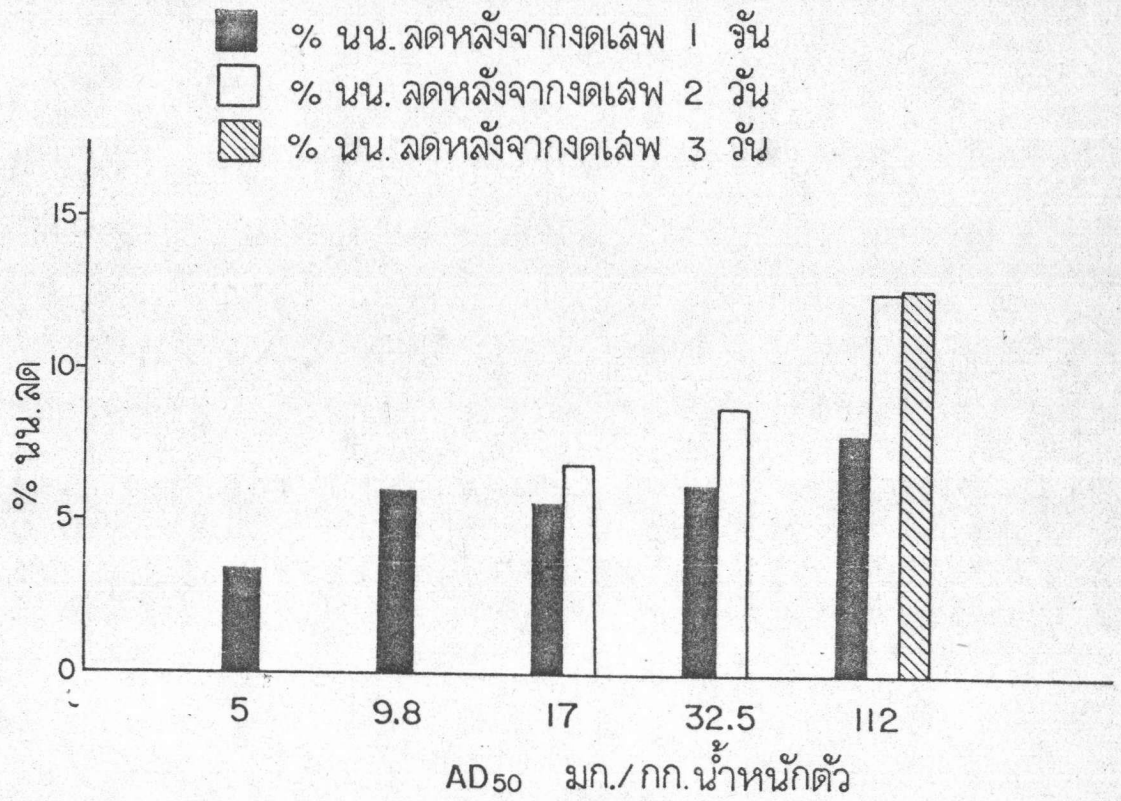
น้ำหนักตัว

↓ งดเสฟ

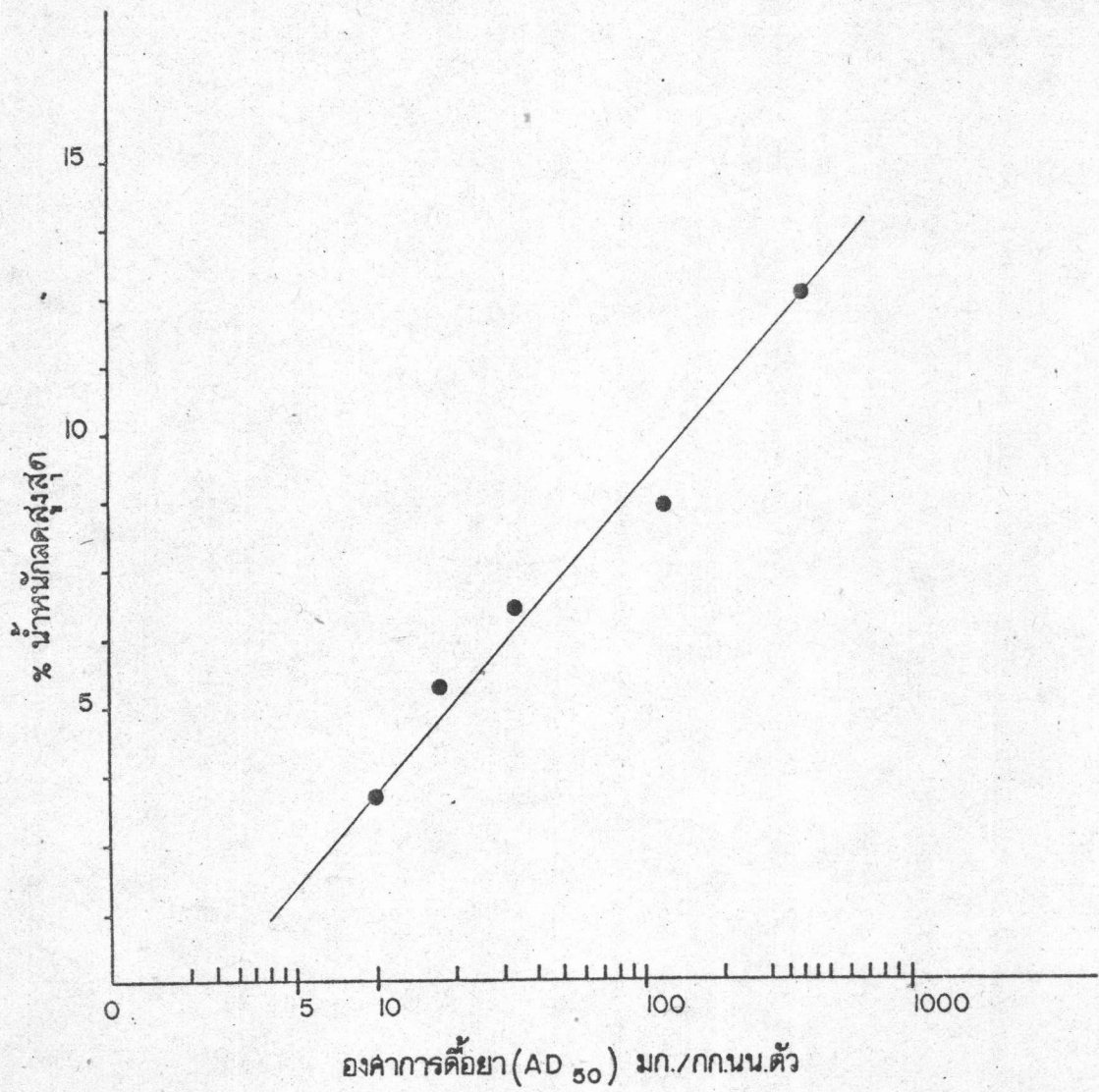


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 วันที่ฉีดมอร์ฟีน
 5 5 5 9.8 9.8 9.8 9.8 17 17 17 32.5 32.5 32.5 32.5 112 112 ความเข้มข้นของมอร์ฟีน มก./กก. น้ำหนักตัว

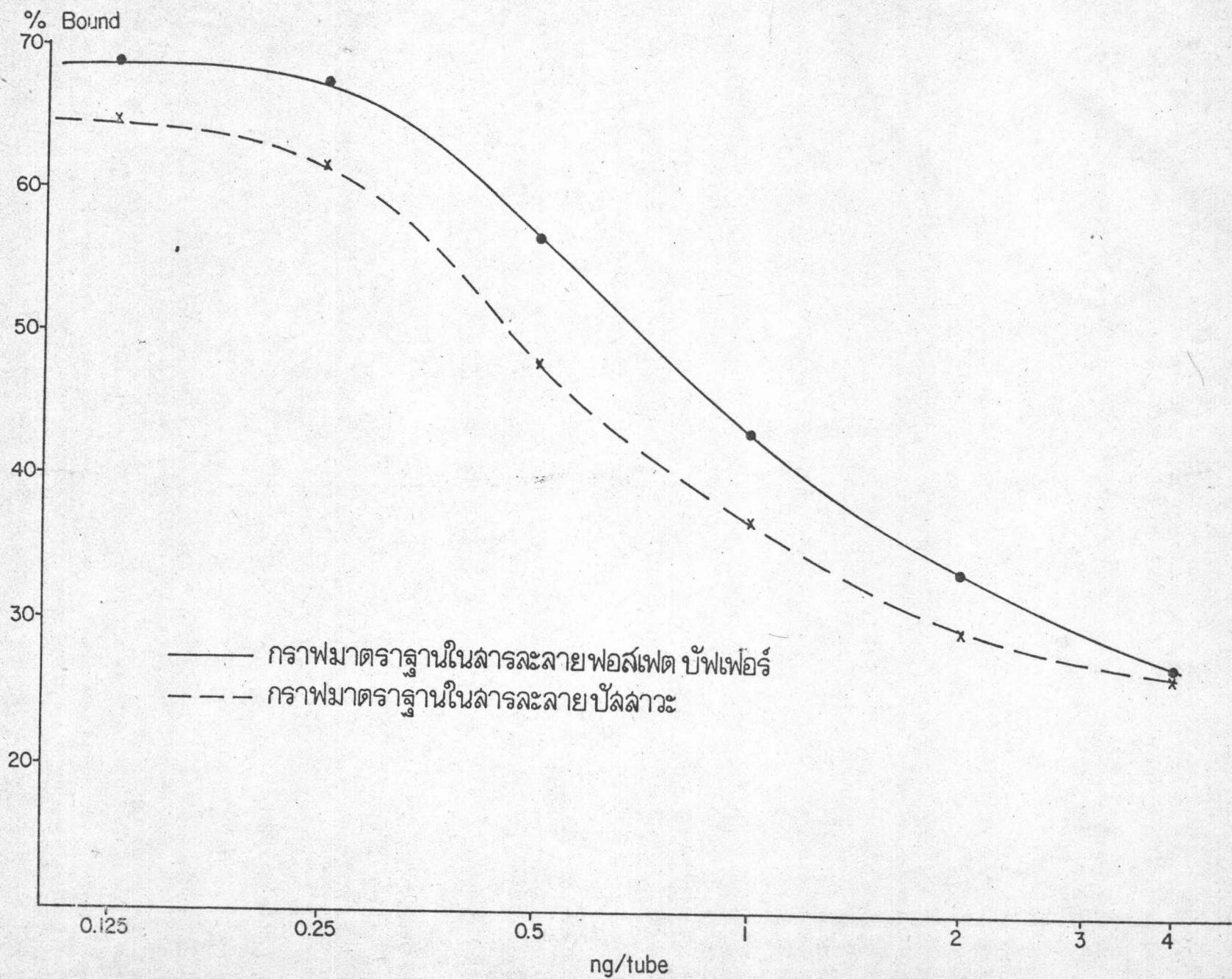
8 ก, ข, ค, ง, จ แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักหนู ในระหว่างพัฒนาการดื้อยา ในแต่ละความเข้มข้นของมอร์ฟีน



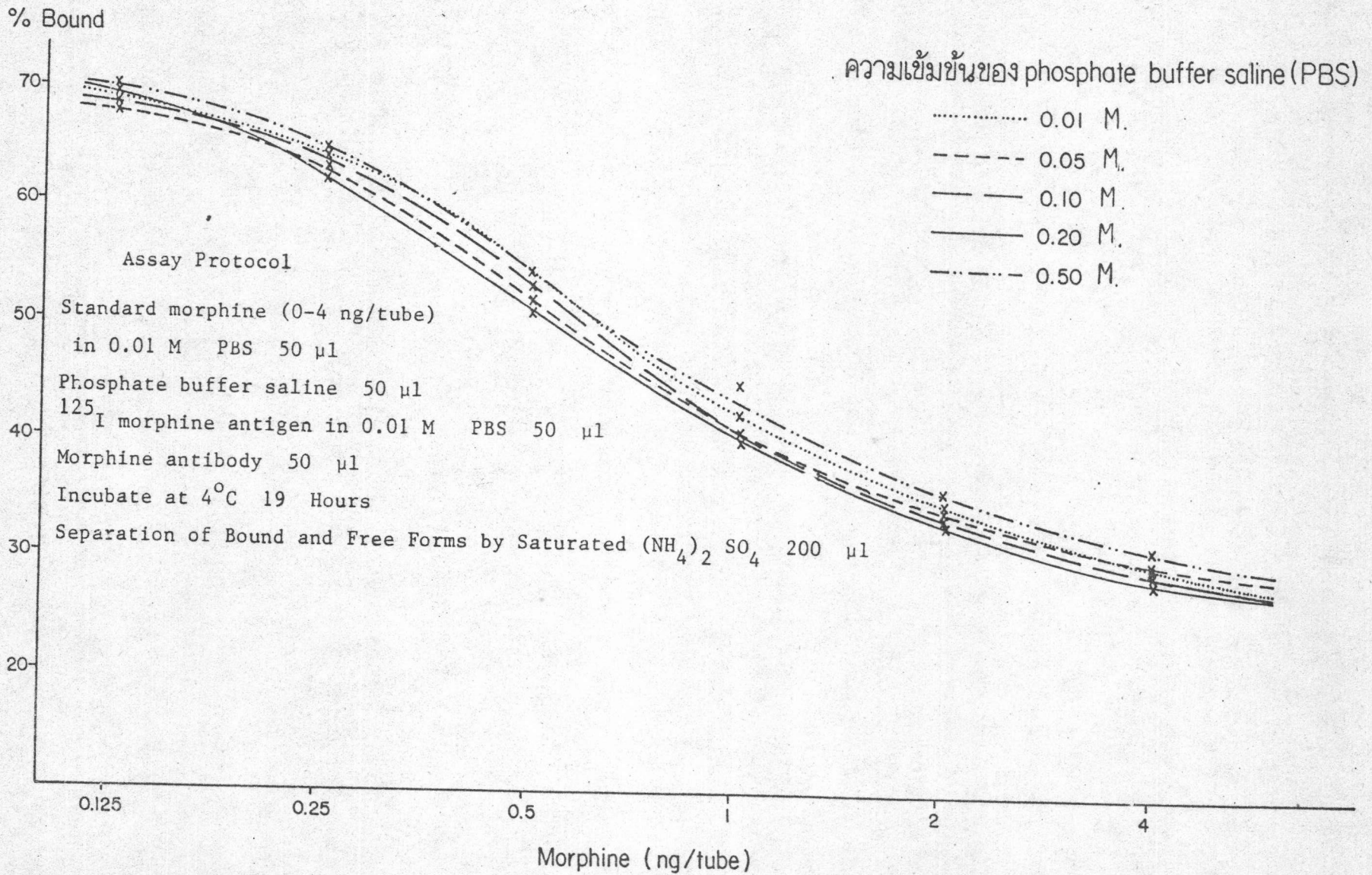
รูปที่ 9 แล่ดงเปอร์เซนต์น้ำหนัลดของหนูตุดยามอร์พินแบบเรื่อร้ง
หลังจากงดเล็พมอร์พินความแ่่มขั้นต่าต่าง ๆ กั้น



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์น้ำหนักลด กับองค์การดีอียา หลังจากหนูทดลองผสมวีฟีน



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานที่ใช้วัดปริมาณมอร์ฟินในปัสสาวะและในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์โดยวิธี RIA



รูปที่ 12 อิทธิพลของ Ionic strength ที่มีต่อกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัด ปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูโดยวิธี RIA

สำหรับผลของ pH ต่อกราฟมาตรฐาน เมื่อละลายมอร์ฟินมาตรฐานให้อยู่ใน 0.01 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน pH ต่าง ๆ คือ 6, 6.5, 7.0, 7.4, 7.9 และ 8.35 ผลการทดลองดังรูปที่ จะเห็นได้ว่ากราฟทั้ง 5 เส้นไม่มีความแตกต่างกัน

ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน เท่ากับ 0.5 โมลาร์ ที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ดังกล่าวนี้จะมีผลทำให้ pH ของสารละลายในปฏิกิริยาการหาปริมาณมอร์ฟิน (ทั้งผลจากการคำนวณและวัดโดยเครื่อง pH meter) มีค่าเท่ากับ 7.06 เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณมอร์ฟิน รูปที่ 14 แสดงให้เห็นลักษณะของกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้หาปริมาณมอร์ฟินในสมองหนู ซึ่งมีค่าร้อยละของการรวมตัวที่มอร์ฟินความเข้มข้น 0.125 และ 4 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง ต่างกันประมาณ 57%

4.4.2 ผลการศึกษาความ เชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ มอร์ฟินในสมองหนู

แคงผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธีวัดปริมาณมอร์ฟินในสมองหนู เมื่อใช้มอร์ฟินมาตรฐาน 0.125 - 4 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง จะเห็นได้ว่าความไวของวิธีวัดปริมาณมีค่า 0.125 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง

ผลการทดสอบความแม่นยำ (precision) ของวิธีการวัดปริมาณมอร์ฟิน จากการนำสารละลายมอร์ฟินซึ่งสกัดจากสมองหนูติดยาหลาย ๆ ตัวมารวมกัน แล้ววัดปริมาณมอร์ฟินภายในการทดลองเดียวกัน และระหว่างการทดลอง (4 ครั้ง) ได้สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนภายในการทดลองเดียวกันเท่ากับ 4.58% และระหว่างการทดลองเท่ากับ 6.47% ดังตารางที่ 4

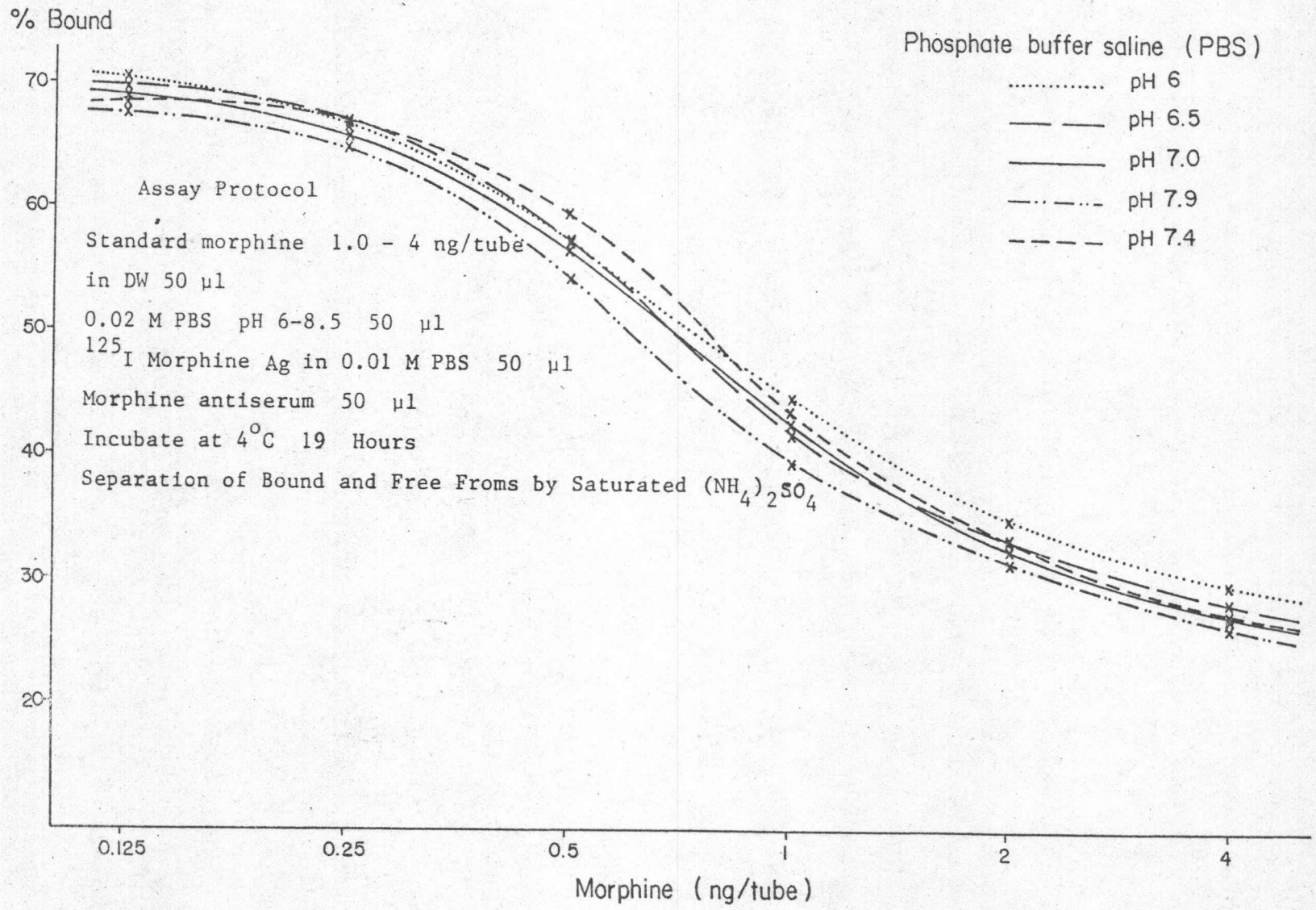
จากการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ของการวัดปริมาณมอร์ฟินในสมองหนูตาม ตารางที่ 5 แสดงให้เห็นถึงการเติมมอร์ฟินปริมาณ 0.25, 0.5, 1 และ 2 นาโนกรัม ลงในสารละลายมอร์ฟินตัวอย่าง แล้ววัดปริมาณมอร์ฟินและคำนวณหา recovery ต้องของวิธีปริมาณได้เท่ากับ 104, 98, 96 และ 98.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

4.4.3 การศึกษาผลของการเจือจางสารละลายมอร์ฟินที่สกัดจาก สมองหนู ให้ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน

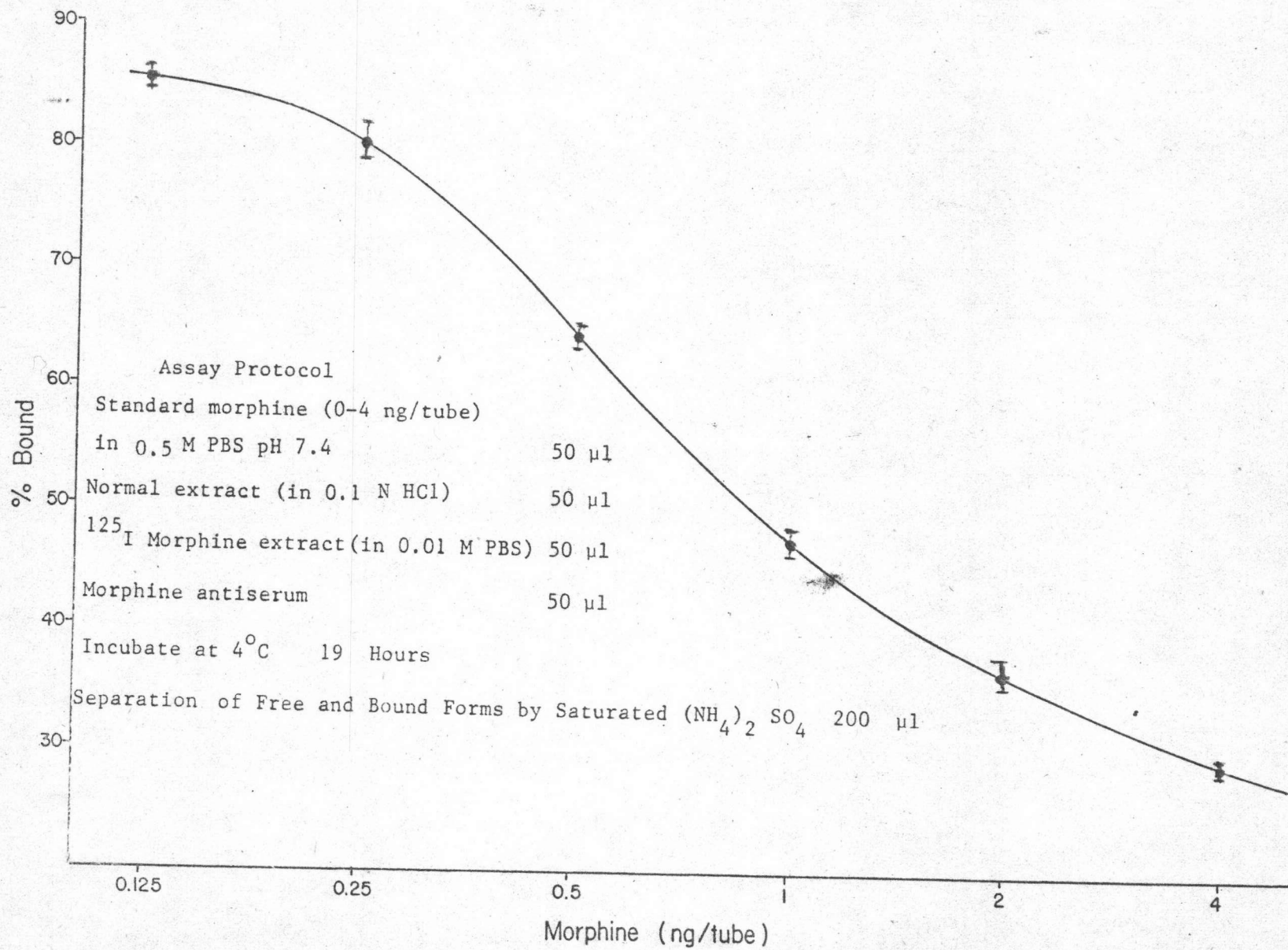
จากกราฟรูปที่ 15 พบว่าสามารถเจือจางมอร์ฟินที่สกัดจากสมองหนู ด้วยสารละลาย ซึ่งสกัดจากสมองหนูปกติได้ถึง 1 ต่อ 128 เท่า โดยที่ค่าของความเข้มข้นของมอร์ฟินที่วัดได้กับจำนวนเท่าของการเจือจาง ยังมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง

4.4.4 ผลการศึกษาระดับมอร์ฟินในแต่ละส่วนของสมองหนู ซึ่งได้รับมอร์ฟินแบบเรื้อรังและเฉียบพลัน

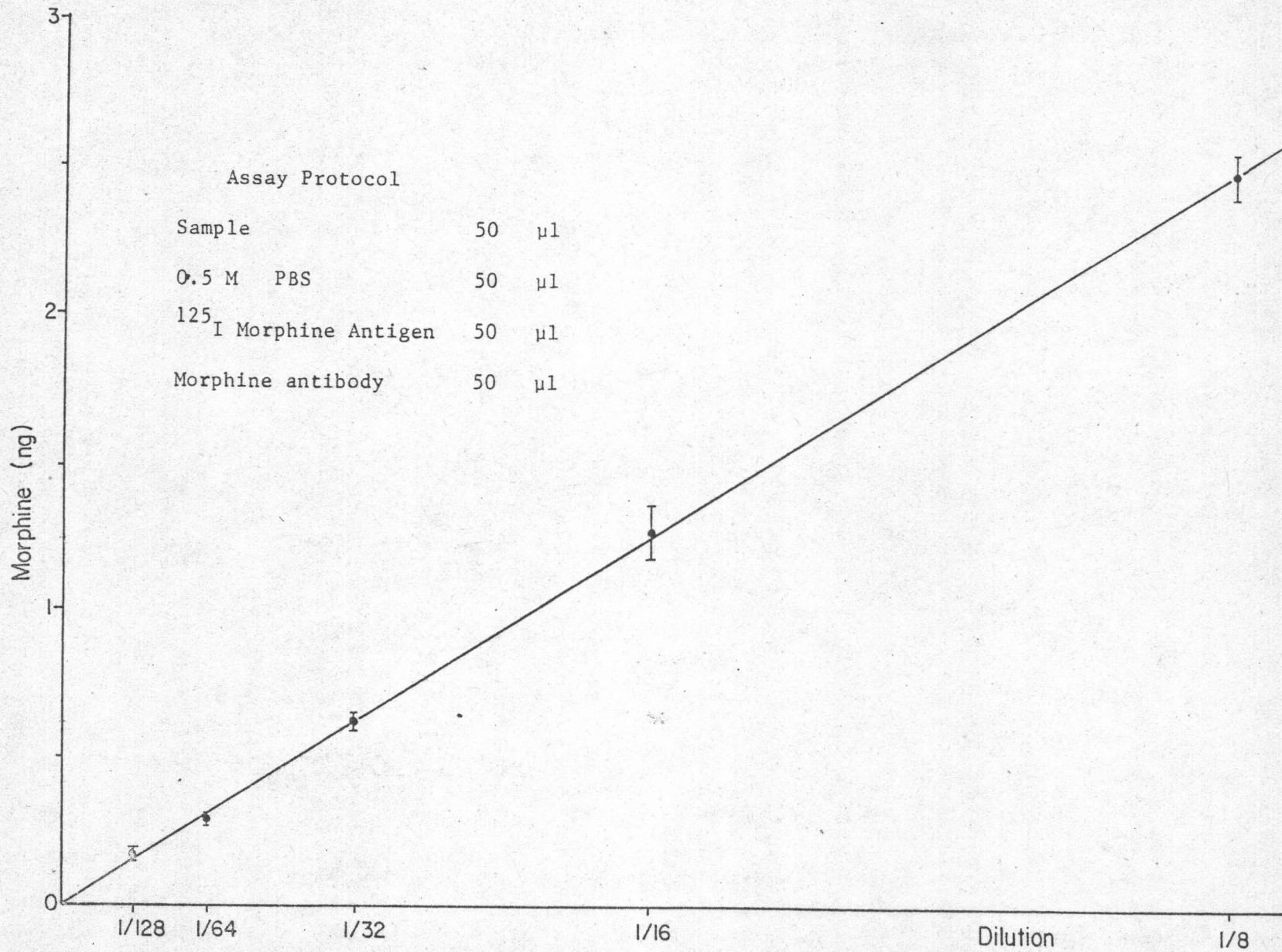
เมื่อใช้หนูทดลอง 6 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว พัฒนาให้คือยามอร์ฟินแบบ



รูปที่ 13 อิทธิพลของ pH ที่มีต่อกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัด ปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูโดยวิธี RIA



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูโดยวิธี RIA



รูปที่ 15. ผลของการเจือจางมอร์ฟีนที่สกัดจากล่อมงหนูให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ด้วยสารละลายที่สกัดจากล่อมงหนูปกติ

ตารางที่ 4 แสดงความแม่นยำของการวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูด้วยวิธี
 รางดิโออิมมูโนแอสเสย์

ค่าสถิติ	Pool Sample (ng/200 μ l)	
	within assay	between assay
\bar{X} (n=4)	0.323	0.34
S.D.	0.015	0.02
% C.V.	4.64	5.88

ตารางที่ 5 แสดงความถูกต้องของการหาปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูด้วยวิธีรางดิโออิมมูโนแอสเสย์

Morphine added * (ng/200 μ l)	Morphine measured (ng/200 μ l)	Percentage recovery
0.25	0.26	104
0.50	0.49	98
1.0	0.96	96
2.0	1.97	98.5

* n = 10

เรื้อรังด้วยองศาการคือยา 5, 9.8, 17, 32.5, 112 และ 300 นาโนกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว แล้ววิเคราะห์หาระดับมอร์ฟินในส่วนต่าง ๆ ของสมองทั้ง 5 ส่วนคือ Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และ Cerebellum ผลการทดลองจากตารางที่ 7 แสดงค่า Mean \pm S.D. ของระดับมอร์ฟินในสมองส่วนต่าง ๆ ทั้ง 5 ส่วน และเมื่อนำค่าต่าง ๆ นี้ไปเขียนกราฟรูปร่างต่างแสดงในรูปที่ 16 จะเห็นว่าเมื่อหนูติดยาด้วยค่าองศาการคือยาเพิ่มขึ้น ระดับมอร์ฟินในสมองทั้ง 5 ส่วนจะเพิ่มขึ้น และระดับมอร์ฟินแต่ละค่าองศาการคือยาที่เพิ่มขึ้นมีค่าแตกต่างจากหนากลุ่มที่มีค่า AD₅₀ ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ทุกค่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อวัดระดับมอร์ฟินในแต่ละส่วนของสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังที่องศาการคือยาต่าง ๆ โดยฆ่าหนูหลังจากฉีดมอร์ฟินนาน 40 นาที พบว่าที่ทุก ๆ ค่าองศาการคือยาสมองส่วน Cerebellum จะมีค่าเฉลี่ยของระดับมอร์ฟิน (Mean) (นาโนกรัม/กรัมสมอง) สูงที่สุด รองลงมาคือ Cortex และที่ค่า AD₅₀ 9.8 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Cortex และ Cerebellum แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สมองส่วนอื่น ๆ คือ Thalamus & Hypothalamus, Mid brain และ Pon & Medulla ของทุกค่าองศาการคือยา มีระดับมอร์ฟินไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อศึกษา ระดับมอร์ฟินในสมองหนู ซึ่งได้รับยาแบบเฉียบพลันด้วยค่าองศาการคือยา (AD₅₀) 5, 9.8, 17, 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ดังตารางที่ 8 พบว่า เมื่อหนูติดยาแบบเฉียบพลันด้วยค่าองศาการคือยาเพิ่มขึ้น ระดับมอร์ฟินในสมองส่วนต่าง ๆ จะเพิ่มขึ้น จากรูปที่ 17 จะเห็นว่าระดับมอร์ฟิน (นาโนกรัม/กรัมสมอง) ในแต่ละค่าองศาการคือยาที่เพิ่มขึ้นมีค่าแตกต่างจากหนากลุ่มที่มีค่า AD₅₀ ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ทุกค่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อเปรียบเทียบระดับมอร์ฟินในสมองหนู ซึ่งได้รับยาแบบเฉียบพลัน ทั้ง 5 ส่วน จากตารางที่ 8 พบว่าเมื่อหนูติดยาด้วยค่า AD₅₀ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สมองส่วน Cerebellum จะมีปริมาณมอร์ฟินมากที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus, Pon & Medulla, Cortex ซึ่งทั้ง ส่วนนี้มีระดับมอร์ฟินเท่า ๆ กัน สมองส่วน Mid brain จะมีระดับมอร์ฟินน้อยที่สุด เมื่อหนูได้รับมอร์ฟินแบบเฉียบพลันด้วยค่าองศาการคือยา 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะพบว่าค่าเฉลี่ยของระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Cerebellum สูงที่สุด แต่ไม่ต่างกับระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Cortex, Thalamus & Hypothalamus อย่างมีนัยสำคัญ ส่วน Mid brain และ Pon & Medulla จะมีค่าเฉลี่ยของระดับมอร์ฟินต่ำที่สุด สมองหนูที่ติดยาแบบเฉียบพลันด้วยองศาการคือยา 17, 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่าเฉลี่ยของระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Cerebellum มากที่สุด รองลงมาคือ Cortex แต่เมื่อเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus, Mid brain และ Pon & Medulla มีค่าเฉลี่ยของระดับมอร์ฟินไล่เสียกัน

ตารางที่ 6

น้ำหนักของแต่ละส่วนของสมองหนูปกติ และหนูติดยามอร์ฟินแบบเรื้อรังด้วยค่าองศาการดี้อยา (AD₅₀) ต่าง ๆ กัน

ส่วนของสมอง	น้ำหนักส่วนต่าง ๆ ของสมองหนู (กรัม)						
	หนูปกติ	องศาการดี้อยา AD ₅₀ มก./กก.นน.ตัว					
		5	9.8	17	32.5	112	300
Cortex	1.059±0.072	1.028±0.052	1.049±0.028	1.028±0.024	1.028±0.056	1.072±0.058	1.02±0.054
Thalamus & Hypothalamus	0.206±0.027	0.211±0.033	0.215±0.029	0.212±0.0186	0.199±0.008	0.194±0.021	0.199±0.036
Mid Brain	0.151±0.023	0.147±0.03	0.155±0.017	0.159±0.0097	0.153±0.010	0.157±0.018	0.159±0.023
Pon & Medulla	0.205±0.021	0.196±0.0156	0.210±0.017	0.201±0.025	0.200±0.033	0.207±0.024	0.196±0.023
Cerebellum	0.295±0.029	0.287±0.009	0.291±0.014	0.284±0.027	0.299±0.007	0.281±0.031	0.291±0.014

แสดงค่า Mean ± S.D. จากการใช้หนูทดลอง 6 ตัว นอกจากหนูปกติ ใช้หนูทดลอง จำนวน 26 ตัว

ตารางที่ 7 แสดงระดับมอร์ฟินในแต่ละส่วนของสมองหนู ซึ่งได้รับมอร์ฟินแบบเรื้อรัง ด้วยค่าองศาการดี้อยา (AD₅₀) ต่าง ๆ กัน

ส่วนของสมอง	ระดับมอร์ฟิน (นาโนกรัม/กรัมสมอง)					
	องศาการดี้อยา AD ₅₀ มก./กก.นน.ตัว					
	5	9.8	17	32.5	112	300
Cortex	145 ± 27 *	290 ± 45 *	575 ± 104	1450 ± 248	4670 ± 967	10909 ± 1499 *
Thalamus & Hypothalamus	129 ± 9 *	233 ± 26	419 ± 76	1047 ± 152	3754 ± 552 *	8249 ± 800
Mid Brain	114 ± 23 *	213 ± 33 *	389 ± 57	964 ± 186	3593 ± 984	7597 ± 1109
Pon & Medulla	111 ± 16	268 ± 23 *	407 ± 85	1047 ± 174	3471 ± 727	7645 ± 1117
Cerebellum	170 ± 42	394 ± 59 *	678 ± 95	1584 ± 389	5288 ± 1271	12842 ± 1586

แสดงค่า Mean ± SD. จากการใช้หนูทดลองจำนวน 6 ตัว

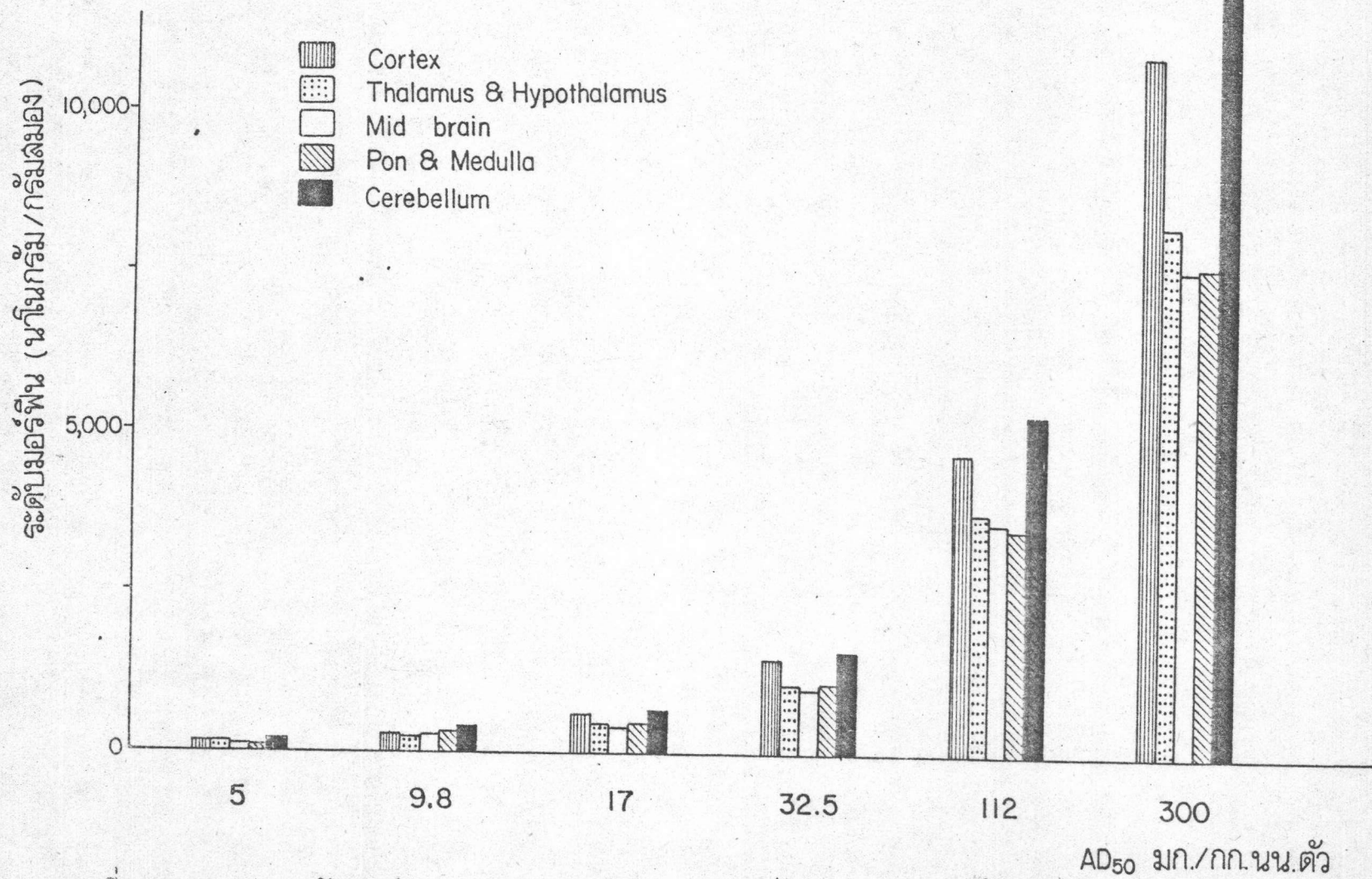
* แตกต่างกับค่ามอร์ฟินในสมองหนูได้รับยาแบบเฉียบพลัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 8 แสดงระดับมอร์ฟินในแต่ละส่วนของสมองหนู ซึ่งได้รับมอร์ฟินแบบเฉียบพลัน ด้วยค่าองศาการดีอยา (AD_{50}) ต่าง ๆ กัน

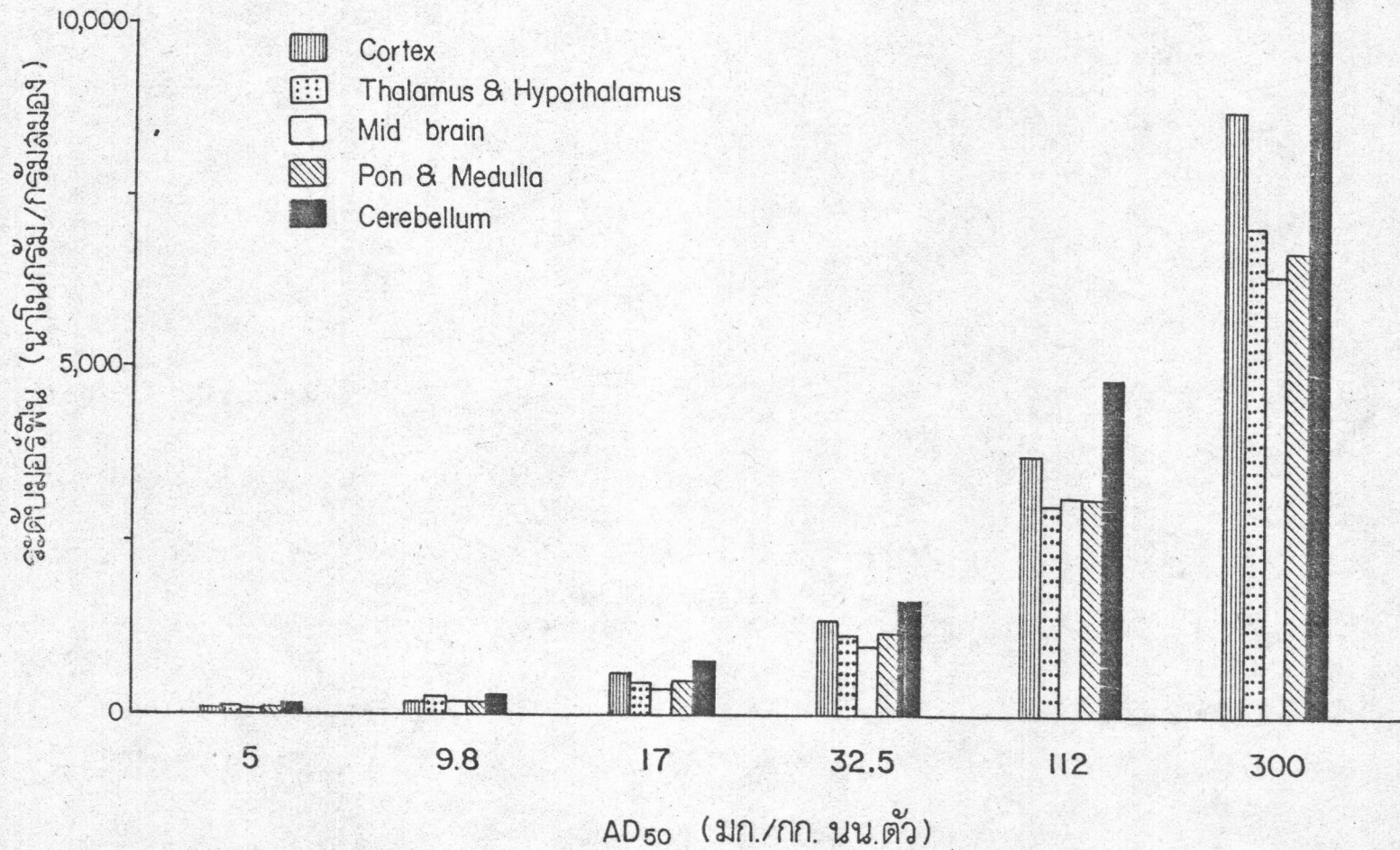
ส่วนของสมอง	ระดับมอร์ฟิน (นาโนกรัม/กรัมสมอง)					
	องศาการดีอยา AD_{50} มก./กก.นน.ตัว					
	5	9.8	17	32.5	112	300
Cortex	76 ± 13 *	197 ± 51 *	597 ± 94	1345 ± 292	3734 ± 405	8782 ± 573 *
Thalamus & Hypothalamus	90 ± 27 *	212 ± 47	402 ± 112	1125 ± 326	3016 ± 353 *	7087 ± 838
Mid brain	45 ± 18 *	166 ± 27 *	337 ± 118	968 ± 215	3138 ± 768	6369 ± 872
Pon & Medulla	86 ± 22	160 ± 29 *	437 ± 90	1152 ± 359	3106 ± 539	6717 ± 90
Cerebellum	137 ± 28	255 ± 33 *	758 ± 133	1631 ± 410	4836 ± 1052	10617 ± 2033

แสดงค่า Mean ± S.D. จากการใช้หนูทดลองจำนวน 5 ตัว

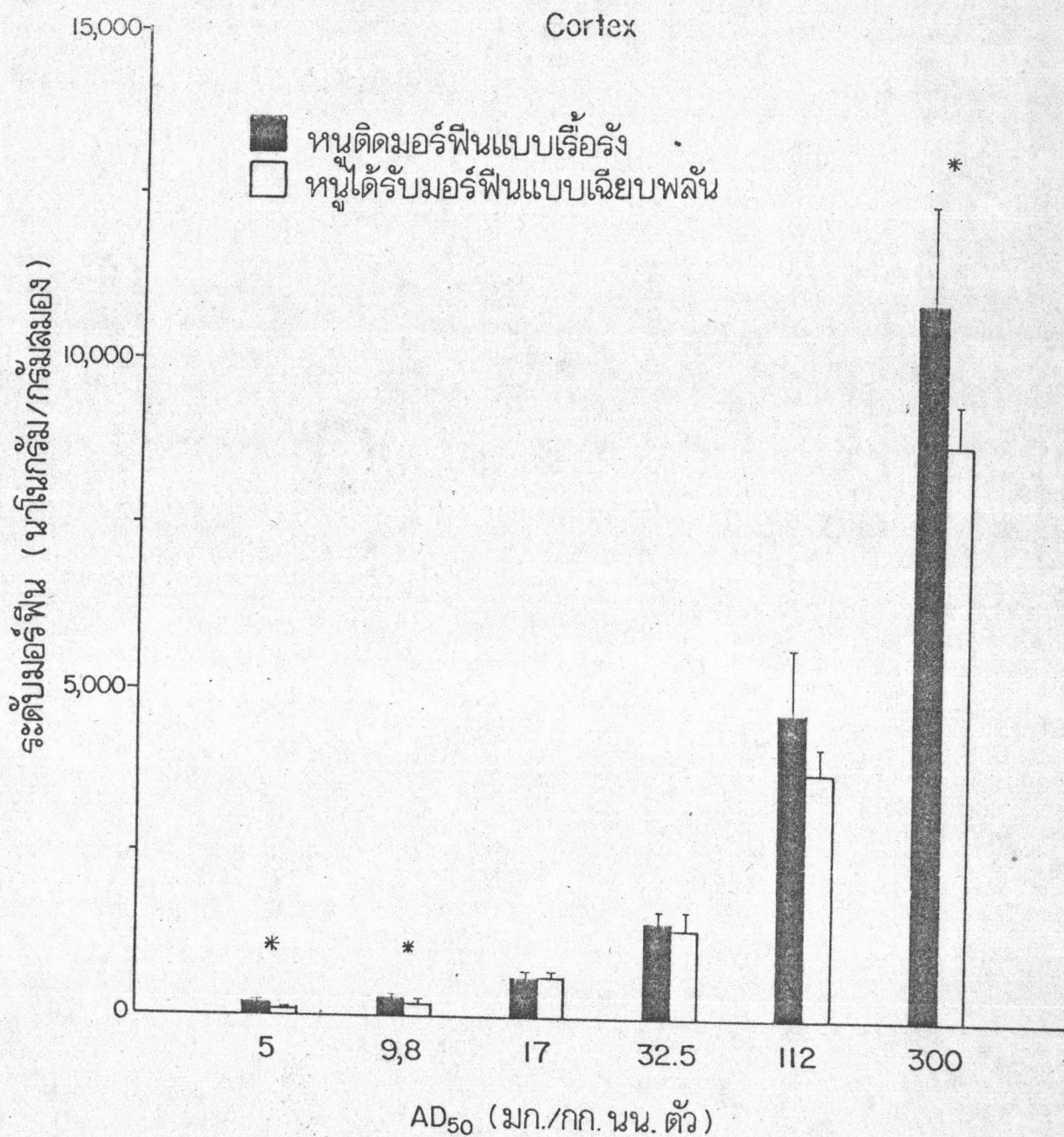
* แตกต่างกับค่ามอร์ฟินในสมองหนูติดยาแบบเรื้อรัง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 16 แสดงระดับมอร์ฟีนในส่วนต่างๆ ของสมองหนูที่ติดมอร์ฟีนแบบเรื้อรังที่ AD₅₀ ต่างๆ



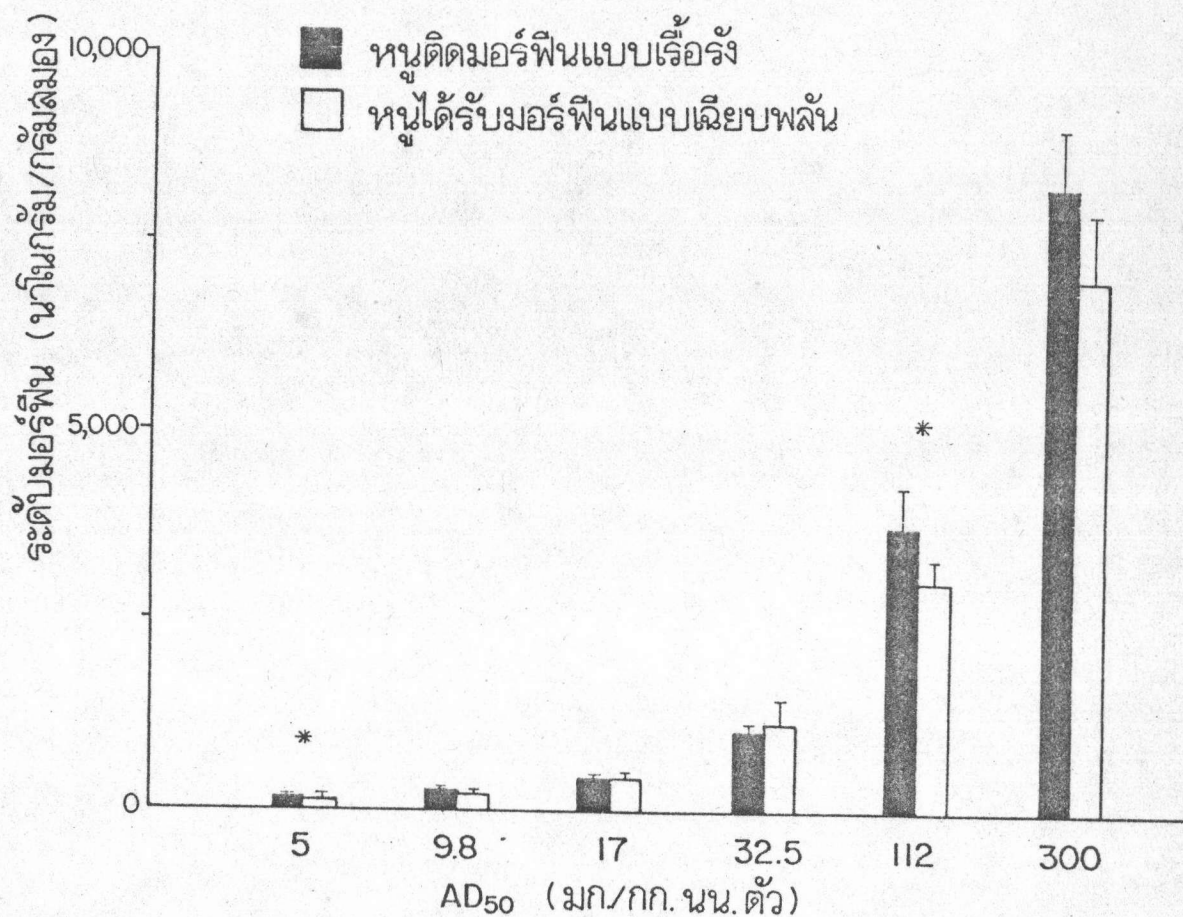
รูปที่ 17 แสดงระดับมอร์ฟีนในลว่นต่างๆ ของสมองหนูที่ได้รับมอร์ฟีนแบบเฉียบพลันที่ AD₅₀ ต่างๆ



รูปที่ 18 เปรียบเทียบ ระดับ มอร์ฟีนในสมองส่วน cortex ของหนูติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลันที่ AD₅₀ ต่างๆ หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที

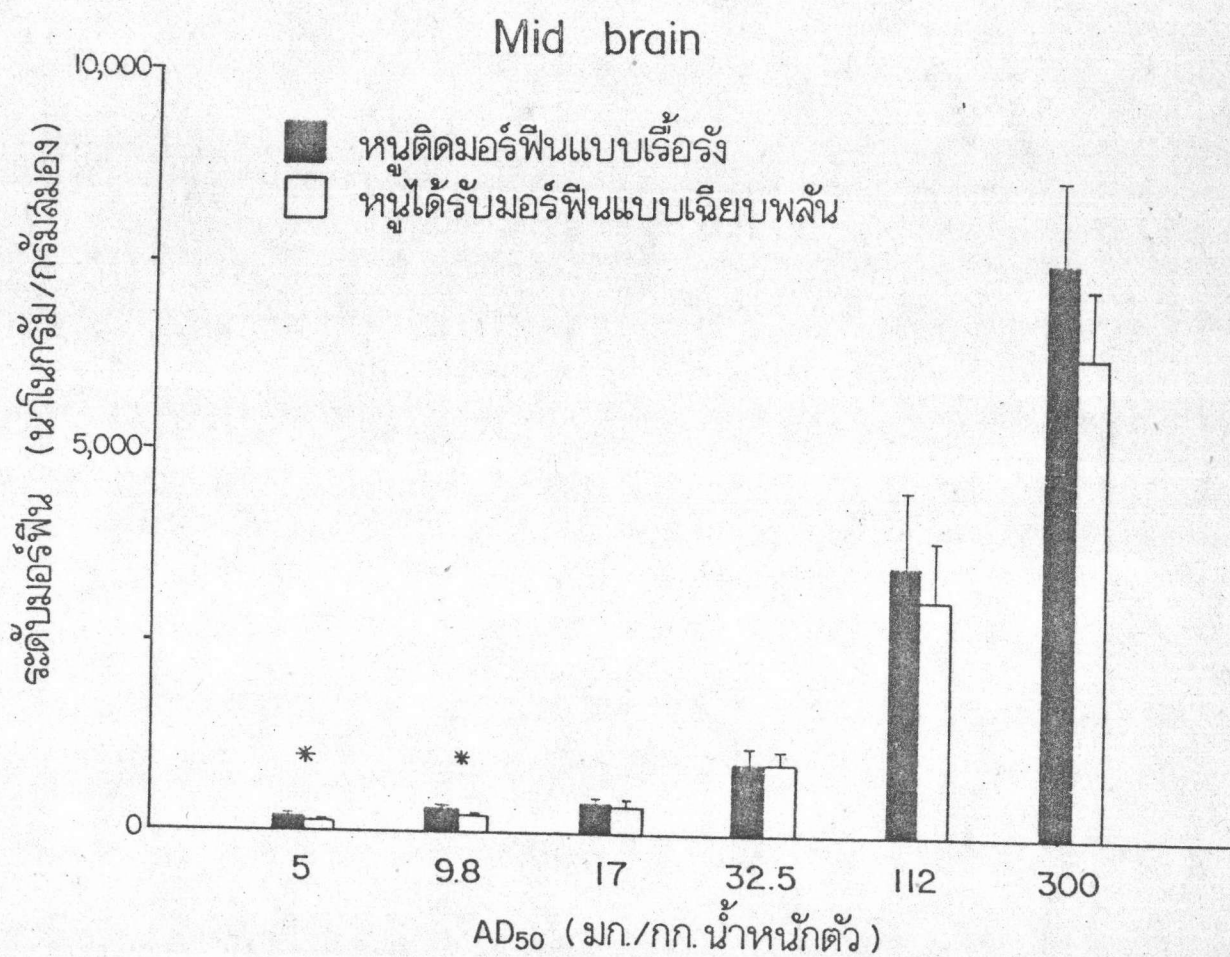
* แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Thalamus & Hypothalamus



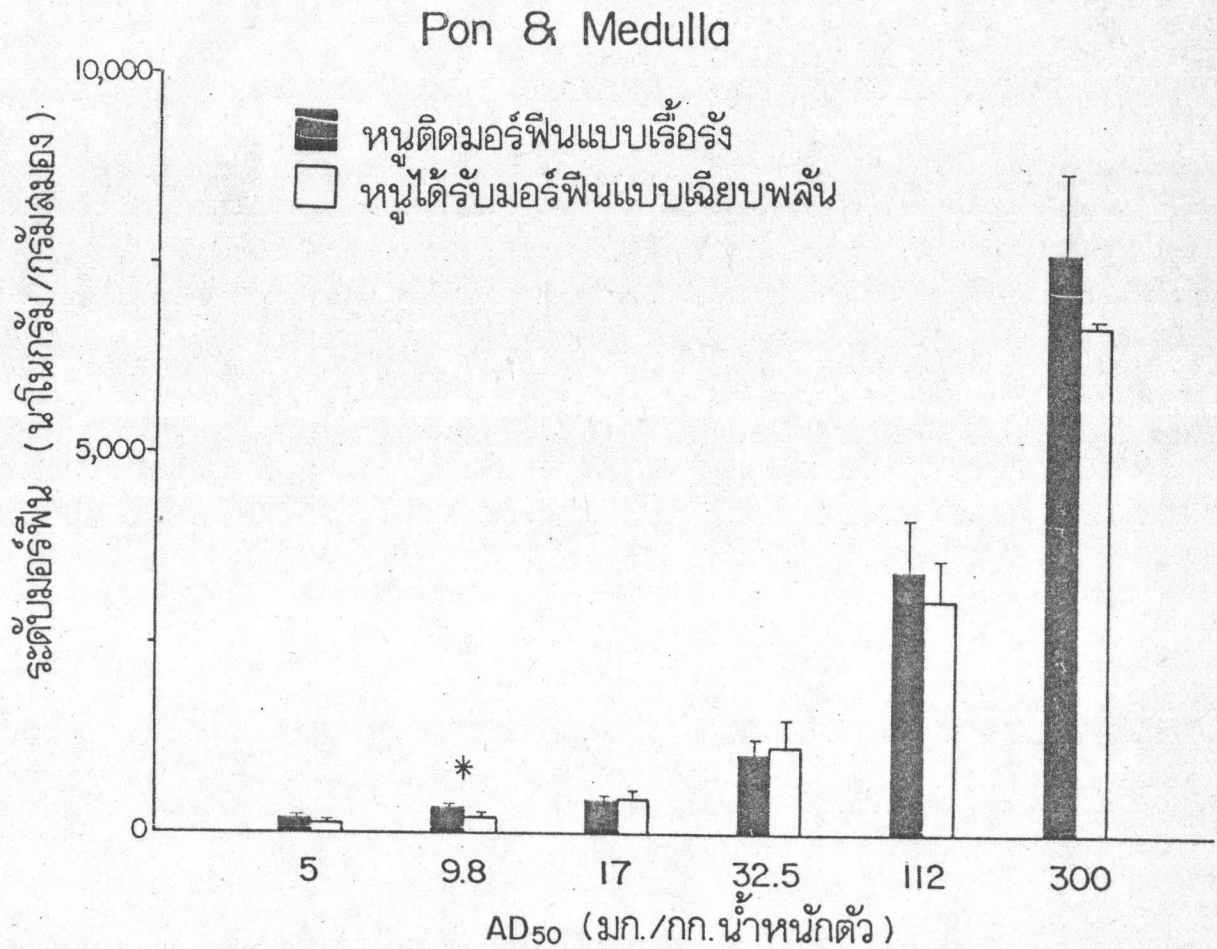
รูปที่ 19 แสดงระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Thalamus และ Hypothalamus ของหนูติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลันที่ AD₅₀ ต่างๆ หลังจากฉีดมอร์ฟินนาน 40 นาที

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



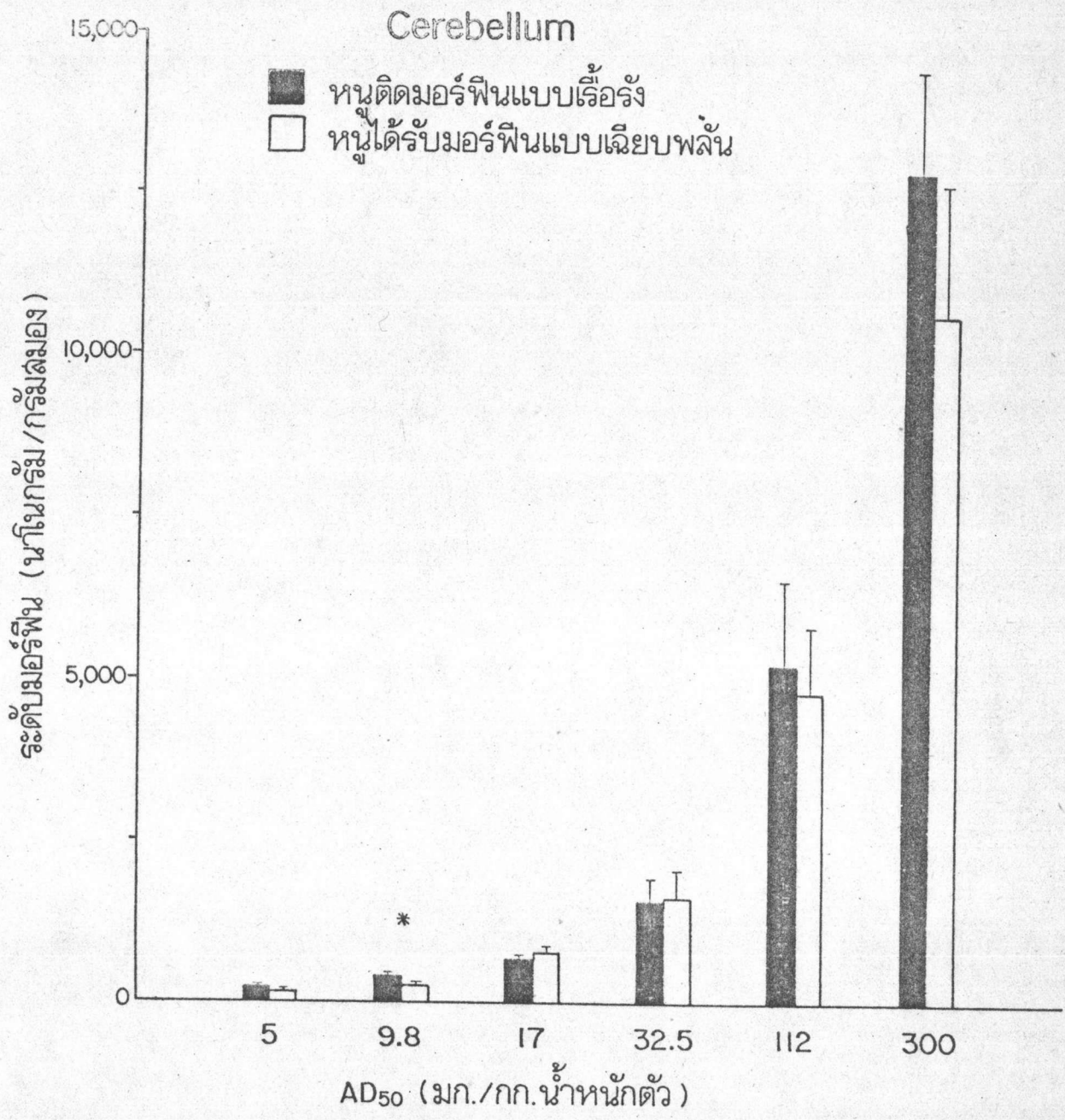
รูปที่ 20 แสดงระดับมอร์ฟีนในสมองส่วน Mid brain ของหนูติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลันที่ AD₅₀ ต่างๆ หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที

* แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



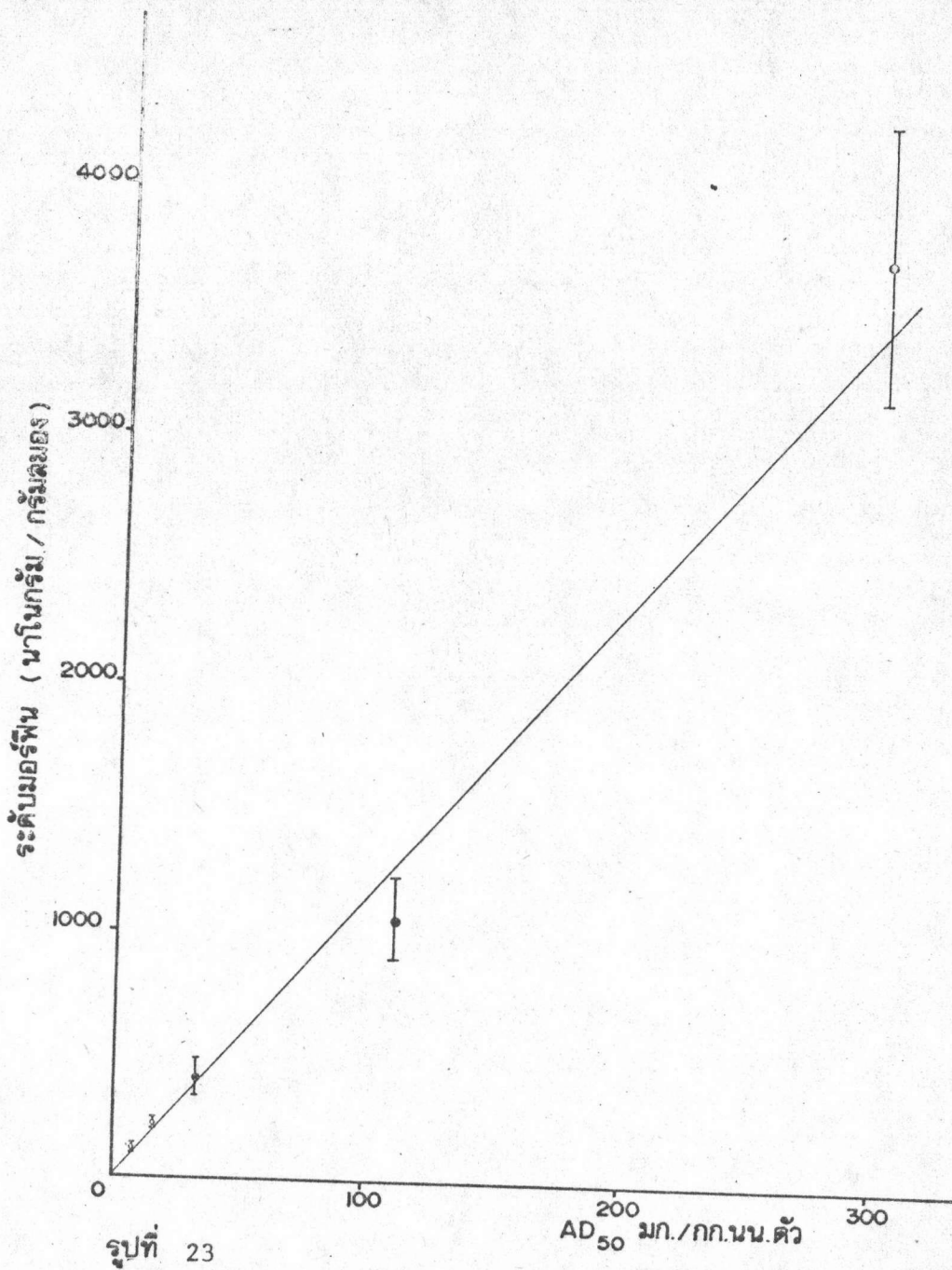
รูปที่ 21 แสดงระดับมอร์ฟีนในสมองส่วน Pon & Medulla ของหนูติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลันที่ AD₅₀ ต่างๆ หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

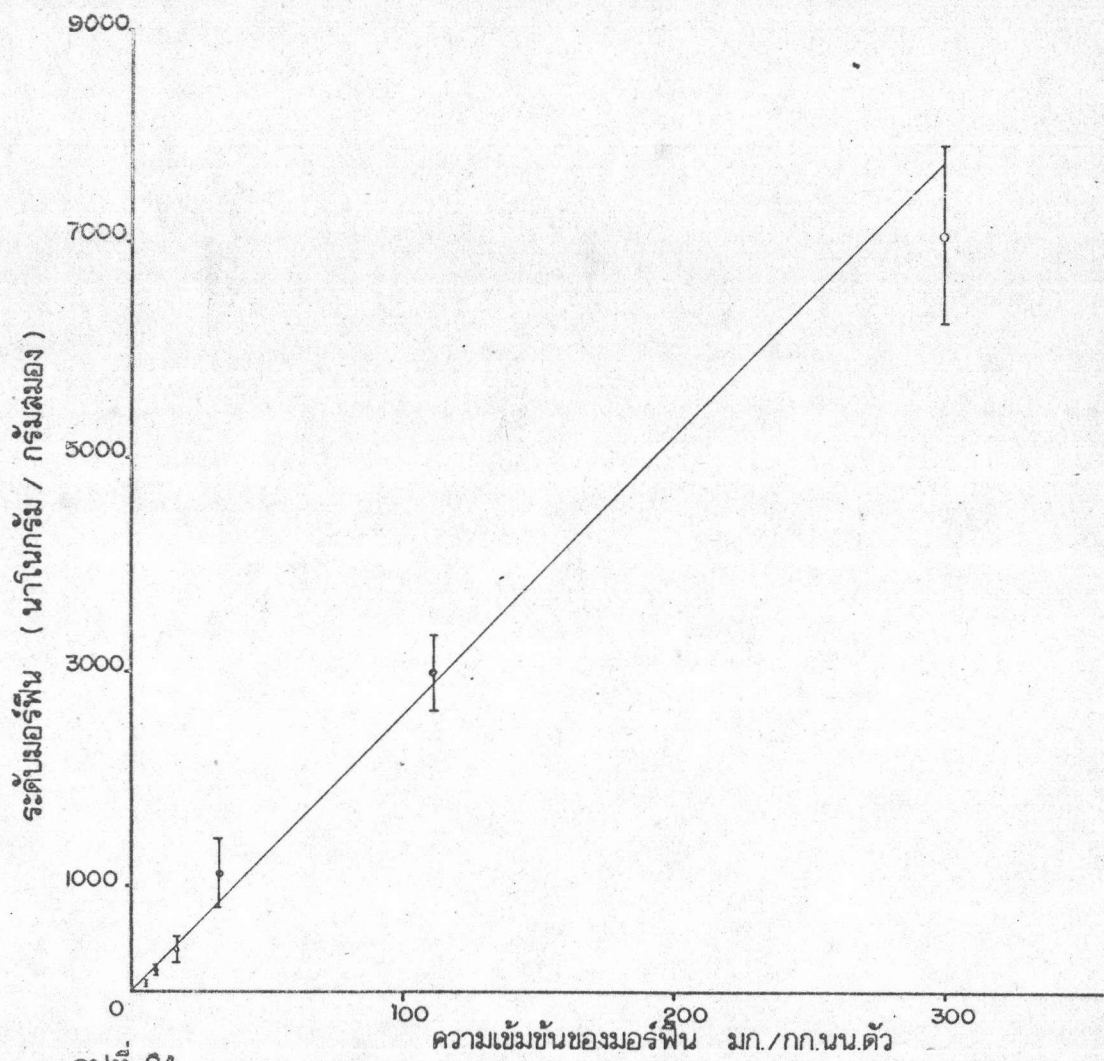


รูปที่ 22 แสดงระดับมอร์ฟีนในสมองส่วน Cerebellum ของหนูติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลันที่ AD₅₀ ต่างๆ หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ของระดับมอร์ฟีน กับค่าองค์การคือยา ในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus ของหนูตัดยาแบบเรื้อรัง.



รูปที่ 24

แสดงความสัมพันธ์ของระดับมอร์ฟีน กับความเข้มข้นของมอร์ฟีน ที่ได้รับในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus ของหนูติดยาแบบเจียบพลัน

ผลการเปรียบเทียบระดับมอร์ฟินในสมองแต่ละส่วน เมื่อหนูได้รับมอร์ฟินแบบเรื้อรังและเฉียบพลันด้วยค่าองศาการค้ำยาต่าง ๆ ในสมองส่วน Cortex (รูปที่ 18) พบว่าที่องศาการค้ำยา 5, 9.8 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ระดับมอร์ฟินในสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังจะมีมากกว่าหนูติดยาแบบเฉียบพลันอย่างมีนัยสำคัญ สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus (รูปที่ 19) ระดับมอร์ฟินในสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังจะสูงกว่าแบบเฉียบพลันที่ค่าองศาการค้ำยา 5 และ 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สมองส่วน Mid brain (รูปที่ 20) ระดับมอร์ฟินในสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังจะมากกว่าแบบเฉียบพลันที่องศาการค้ำยา 5 และ 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สมองส่วน Pon & Medulla และ Cerebellum (รูปที่ 21,22) ระดับมอร์ฟินในสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังจะสูงกว่าแบบเฉียบพลันที่องศาการค้ำยา 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเมโทไอโอนีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนู

4.5.1 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเมโทไอโอนีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนู

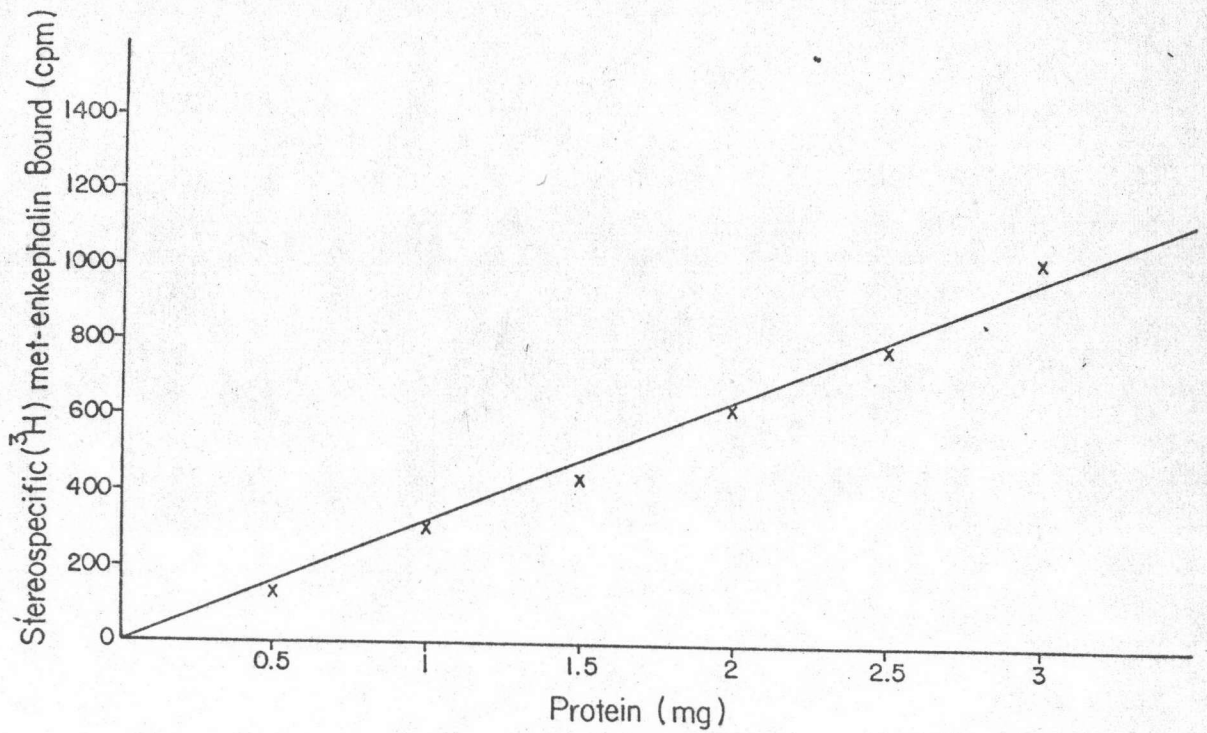
4.5.1.1 การศึกษาปริมาณรีเซพเตอร์โปรตีนที่เหมาะสม

จากการใช้จำนวนรีเซพเตอร์โปรตีน ซึ่งเตรียมตามวิธีข้อ 3.12.1 ปริมาณต่าง ๆ กัน มาทำปฏิกิริยากับ ^3H -เมโทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน 0.67 นาโนโมลาร์ มอร์ฟิน 10^{-5} โมลาร์ หรือน้ำกลั่นและแอสีทราซิน 118.8 ไมโครกรัม ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ปริมาตรทั้งหมด 2 มิลลิลิตร แล้วทำการทดลองต่อตามวิธี 3.12.2 จากรูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่าปริมาณรีเซพเตอร์โปรตีน ตั้งแต่ 0.5 - 3 มิลลิกรัมต่อหลอดทดลอง เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า Stereospecific binding ของ ^3H -เมโทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ในการทดลองจึงได้เลือกใช้ปริมาณรีเซพเตอร์โปรตีนเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อหลอดทดลอง

4.5.1.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

เมื่อใช้วิธีข้อ 3.12.2 ในการศึกษาผลกระทบของเวลาต่อปฏิกิริยาระหว่าง ^3H -เมโทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน โดยการอินคิวเบตสารละลายในเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 5 ถึง 60 นาที จากกราฟรูปที่ 26 จะพบว่า Stereospecific binding ของ ^3H -เมโทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน เป็นสัดส่วนโดยตรงกับช่วงเวลาที่ใช้ อินคิวเบตในเวลาระหว่าง 0 ถึง 25 นาที หลังจากนั้นอัตราการจับกันจะลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลา 25 นาที ในการอินคิวเบต เพื่อหาปริมาณเมโทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน

4.5.1.3 การศึกษาความเข้มข้นของมอร์ฟินที่ใช้ทำ Non specific binding



รูปที่ 25 ความเข้มข้นของโปรตีนที่มีผลต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³H)met-enkephalin กับ receptor protein

Incubation Mixture

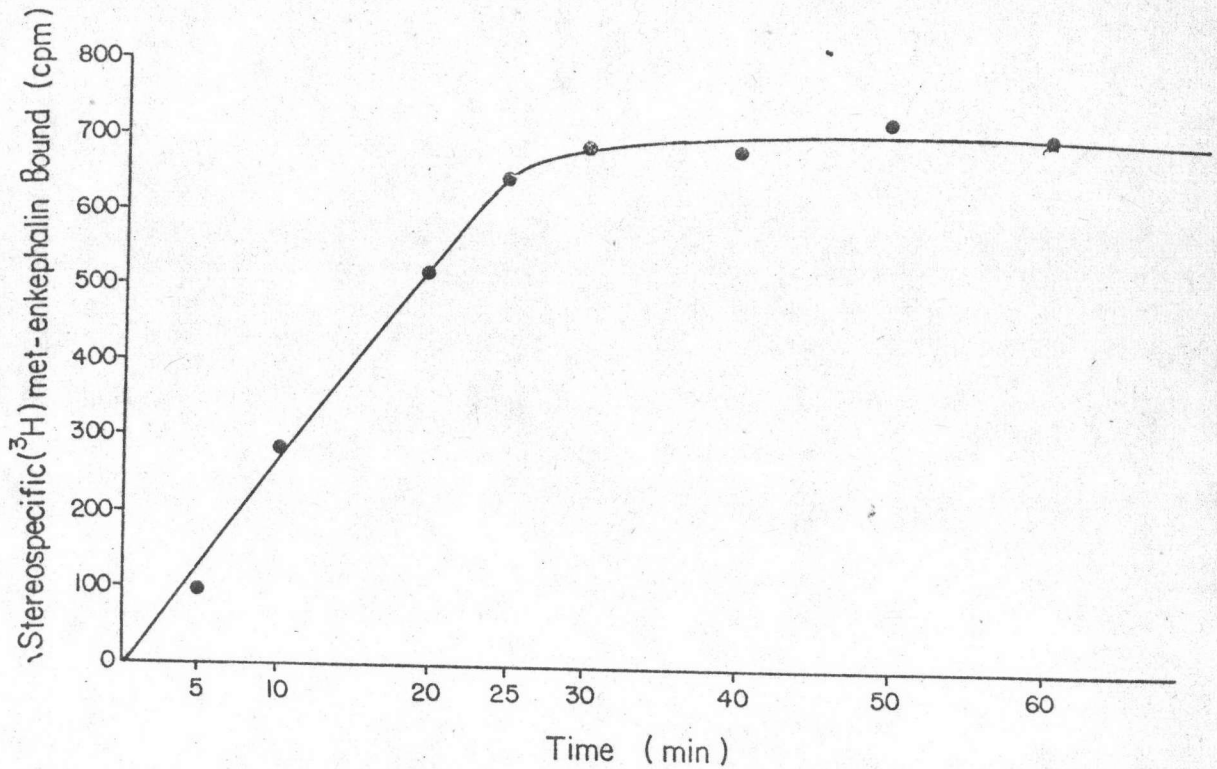
Receptor protein 0.5 - 3 mg.

Bacitracin 118.8 μg

³H met-enkephalin 0.67 nM.

Morphine HCl 10⁻⁵ M or Distilled water.

Incubate in 50 mM. tris-HCl buffer pH 7.7 2 ml at 25°C 25 min



รูปที่ 26 ผลของเวลาที่ใช้ในการ assay ต่อปฏิกิริยาการจับกัน ระหว่าง (³H)met-enkephalin กับ receptor protein

Incubation Mixture

Receptor protein 2.5 mg

Bacitracin 118.8 μ g

³H met enkephalin 0.67 nM.

Morphine HCl 10^{-5} M. or Distilled water

Incubate in 50 mM. tris-HCl buffer pH 7.7 2 ml 5-60 min.
at 25°C

เมื่อเติมมอร์ฟินความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-10} ถึง 10^{-3} โมลาร์ ลงในสารละลายที่ใช้ศึกษาการจับกันระหว่าง ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์-โปรตีน แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีข้อ 3.12.2 ผลการทดลองจากรูปที่ 27 จะเห็นว่ามอร์ฟิน ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ จะแย่งและทำให้ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน จับกับรีเซพเตอร์โปรตีนได้น้อยที่สุด ดังนั้นตลอดการทดลอง จึงใช้ มอร์ฟินความเข้มข้นนี้ในการหา Non-specific binding ของ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน

4.5.1.4 การศึกษาปริมาณ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลินที่เหมาะสม

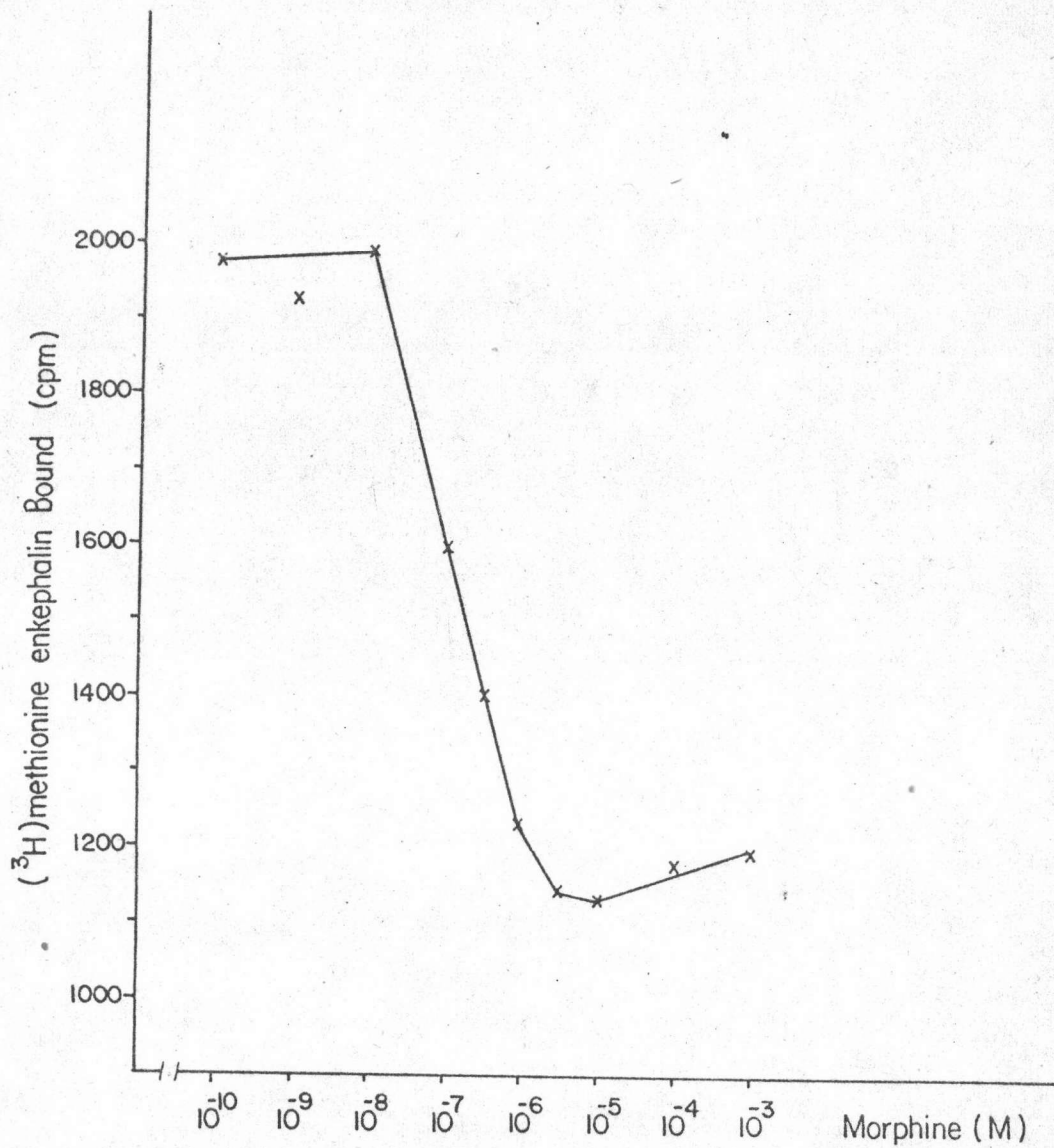
เมื่อทดลองใช้ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลินปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0.335, 0.67, 1.005, 1.34, 1.675 และ 2.01 นาโนโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับรีเซพเตอร์โปรตีน 2.5 มิลลิกรัม ตามวิธีข้อ 3.12.2 ผลการทดลองจากรูปที่ 28 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ค่า Stereospecific binding จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วน โดยตรงกับปริมาณ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ที่ใช้ จนกระทั่งหลังจากความเข้มข้น 0.84 โมลาร์ อัตราการเพิ่มของค่า Stereospecific binding จะลดลงและไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ที่ใช้ ในการวิจัย ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน เท่ากับ 0.67 นาโนโมลาร์

4.5.1.5 การศึกษา pH ของ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาการจับของ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน (เช่นเดียวกับวิธีข้อ 3.12.2) ในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ คือ 6.2, 7.2, 7.7, 7.9 และ 8.15 ผลการทดลองในรูปที่ 29 พบว่าการจับกันระหว่าง ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ pH ของ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์เพิ่มขึ้น และมีการจับกันสูงสุดเมื่อใช้ pH ของบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.7 การจับกันจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ มากกว่า 7.7

4.5.1.6 การศึกษาปริมาณแบบแบชิตราซินที่เหมาะสม

เมื่อใช้แบบชิตราซินปริมาณต่าง ๆ คือ 39.6, 79.2, 118.8, 158.4 และ 1.98 ไมโครกรัม ในสารละลายที่ใช้ศึกษาการจับกันระหว่าง ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน ตามวิธีข้อ 3.12.2 ผลการทดลองรูปที่ 30 พบว่าแบบชิตราซิน 118.8 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง มีผลทำให้ ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน จับกับรีเซพเตอร์โปรตีนได้ดีที่สุด เมื่อใช้แบบชิตราซินน้อยหรือมากกว่านี้ การจับกันระหว่าง ^3H -เมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลินจะค่อย ๆ ลดน้อยลง



รูปที่ 27 แสดงความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่มีผลกระทบต่อการจับกันระหว่าง (³H) methionine enkephalin กับ receptor protein

Incubation Mixture

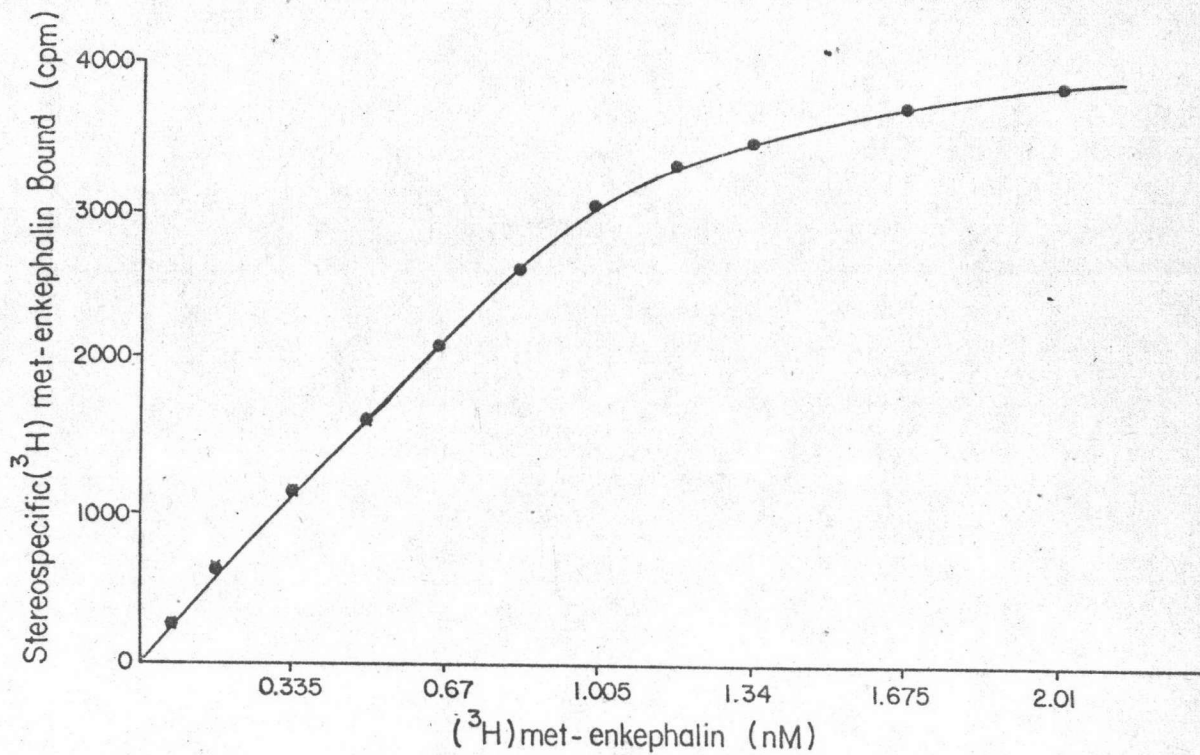
Receptor protein 2.5 mg

Bacitracin 118.8 μg

³H-met-enkephalin 0.67 nM.

Morphine HCl 10⁻¹⁰ - 10⁻³ M.

Incubate in 50 mM. tris-HCl buffer pH 7.7 2 ml. at 25°C
25 min.



รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ(³H)met-enkephalin กับ ความสามารถของ(³H)met-enkephalin ในการจับกับ receptor protein

Incubation Mixture

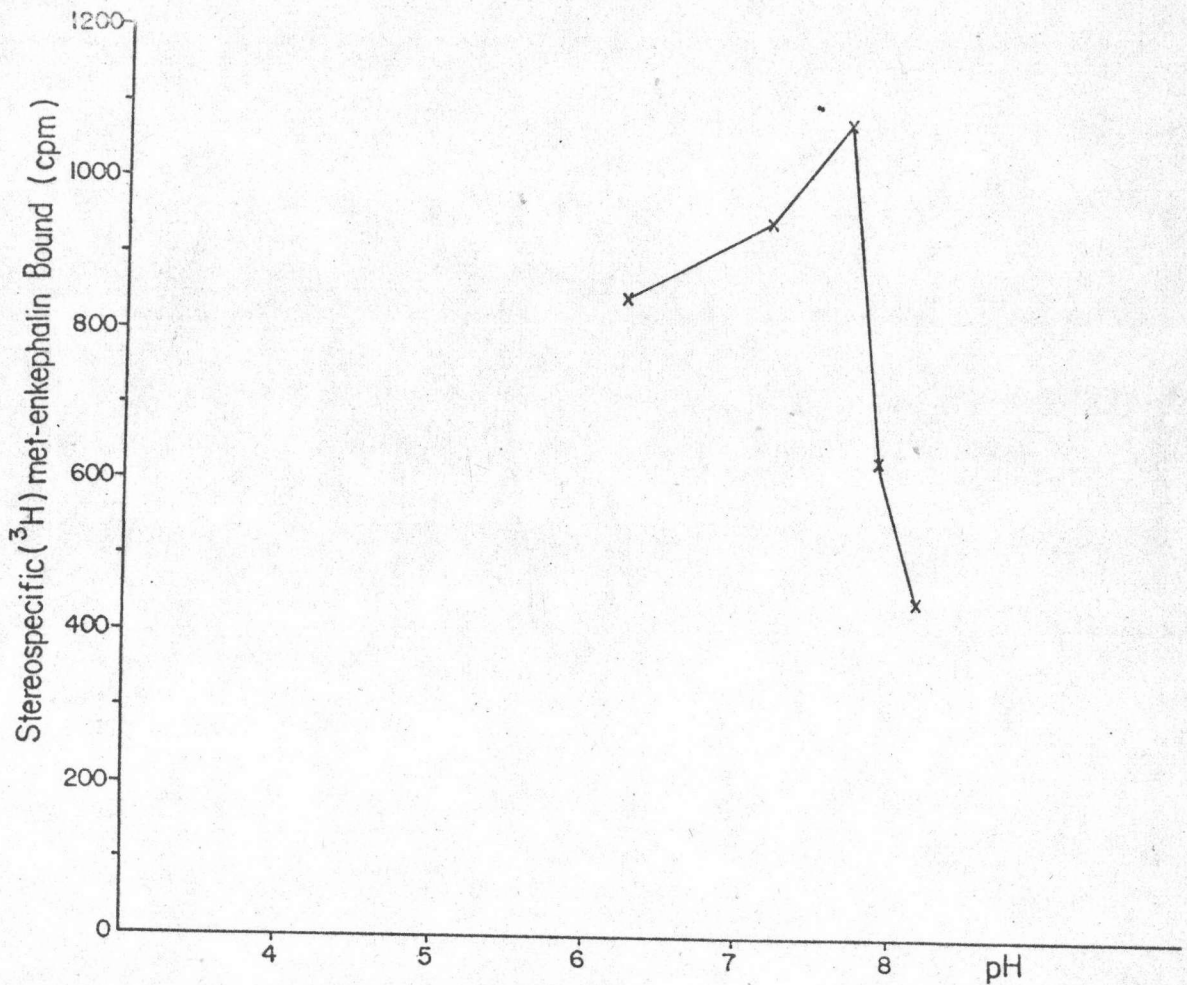
Receptor protein 2.5 mg

Bacitracin 118.8 μg

³H-met-enkephalin 0.067 - 2.01 nM

Morphine HCl 10⁻⁵ M or Distilled water

Incubate in 50 mM. tris-HCl buffer pH 7.7 2 ml at 25°C 25 min



รูปที่ 29 ผลของ pH ของสารละลาย Tris-HCl buffer. ต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³H)met-enkephalin กับ receptor protein

Incubation Mixture

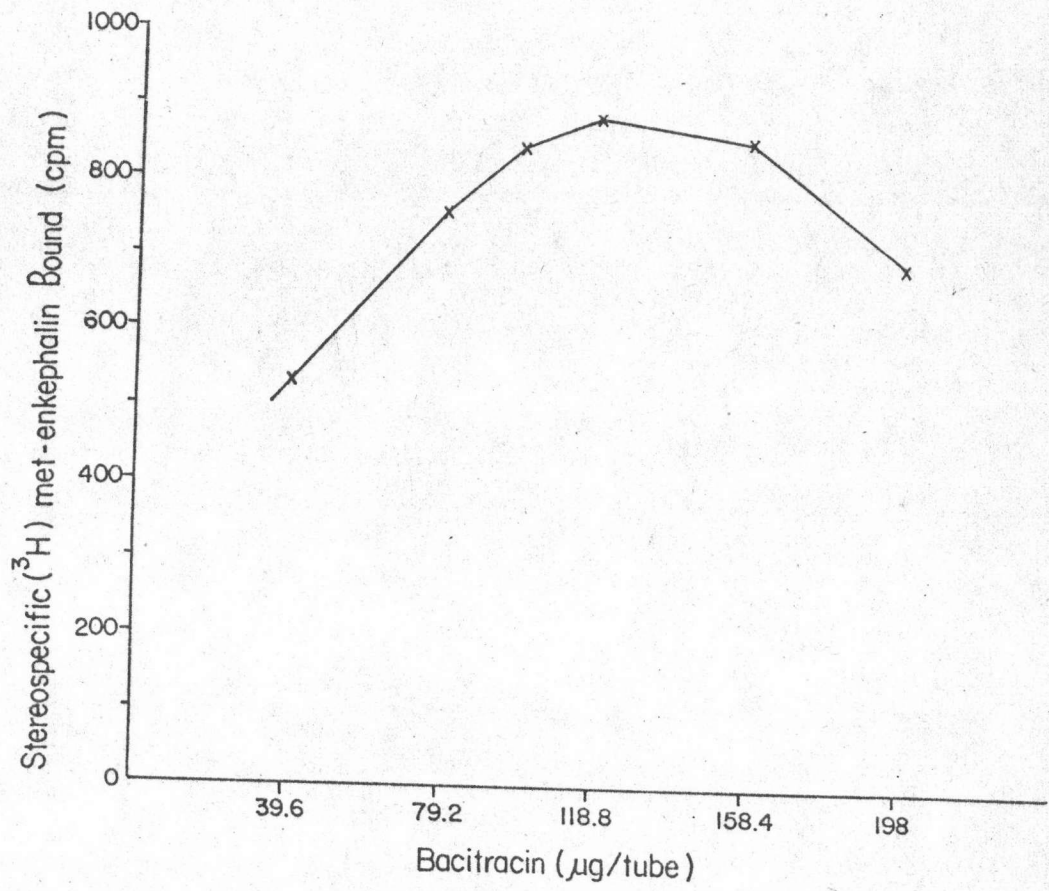
Receptor protein 2.5 mg

Bacitracin 118.8 μg

³H-met-enkephalin 0.67 nM.

Morphine HCl 10⁻⁵ M or Distilled water

Incubate in 50 mM. tris-HCl buffer pH 6-8 2 ml at 25°C 25 min.



รูปที่ 30 ผลของความเข้มข้นของ Bacitracin ต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³H)met-enkephalin กับ receptor protein

Incubation Mixture

- Receptor protein 2.5 mg
- Bacitracin 39.6 - 198 µg
- ³H--met-enkephalin 0.67 nM.
- Morphine HCl 10⁻⁵ M. or Distilled water
- Incubate in 50 mM. tris-HCl buffer pH 7.7 2 ml at 25°C 25 min.

4.5.1.7 การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน

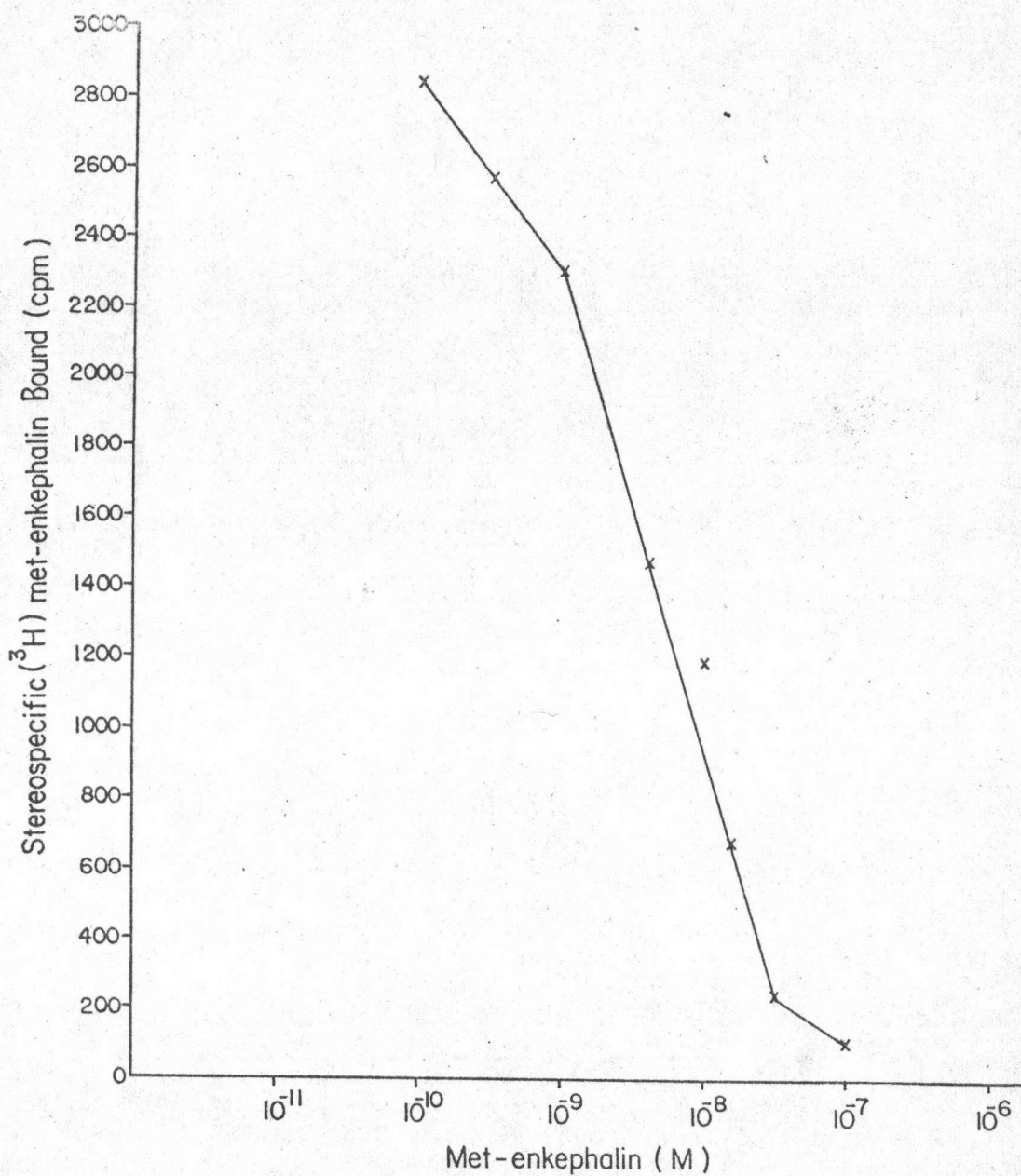
จากผลการทดลองรูปที่ 24 เมื่อเติมเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-7} , 5×10^{-8} , 10^{-9} และ 10^{-10} โมลาร์ ลงในสารละลายที่ใช้ศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน ตามวิธีข้อ 3.12.2 เพื่อศึกษาผลกระทบของเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน ผลการทดลองจากรูปที่ 31 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน ระหว่าง 10^{-9} ถึง 5×10^{-8} โมลาร์ ค่า Stereospecific binding ของ ^3H -เมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน จะลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรง ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงสร้างกราฟมาตรฐานขึ้นโดยใช้ความเข้มข้นของเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลินมาตรฐาน เท่ากับ 2.5×10^{-9} , 5×10^{-9} , 7.5×10^{-9} , 10^{-8} และ 1.5×10^{-8} โมลาร์ หรือเท่ากับ 5, 10, 15, 20 และ 30 พิโคโมลต่อหลอดทดลอง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำค่า C_0/C_x มาพล็อตกับปริมาณเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลินมาตรฐานจะได้กราฟเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่

4.5.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนูปกติ

จากตารางที่ 9 และรูปที่ 34 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในสมองหนูปกติ สมองแต่ละส่วน จะมีระดับเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน ไม่เท่ากัน สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus จะมีระดับเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลินสูงที่สุดถึง 2613 ± 296 พิโคโมล/กรัมสมอง รองลงมาคือ Mid brain, Pon & Medulla และ Cortex ส่วน Cerebellum มีระดับเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลินต่ำที่สุดเพียง 691 ± 114 พิโคโมล/กรัมสมอง

4.6 การวิเคราะห์หาระดับรีเซพเตอร์ของเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน และค่า dissociation constant ของการจับระหว่าง ^3H -เมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีนในสมองหนู

เมื่อทำการวิเคราะห์หาระดับรีเซพเตอร์ของเมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลินกับค่า dissociation constant ของการจับกันระหว่าง ^3H -เมทไอโอดีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีนในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนูปกติ และหนูติดยามอร์ฟินแบบเรื้อรังด้วยค่าองศาการดื้อยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยใช้หนูปกติและหนูศึกษาค่าละ 20 ตัว แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม และฆ่าหนูหลังจากฉีดมอร์ฟินความเข้มข้นที่ต้องการแล้วนาน 40 นาที แบ่งสมองออกเป็นส่วน ๆ คือ Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla, และ Cerebellum นำแต่ละส่วนของสมองหนูในกลุ่มเดียวกันรวมกัน แล้วนำไปทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.13 โดยใช้ Scatchard Plot ดังตัวอย่างรูปที่ 33 ซึ่งแสดงการพล็อตระหว่างค่า Bound/Free (B/F) และค่า Bound (B)

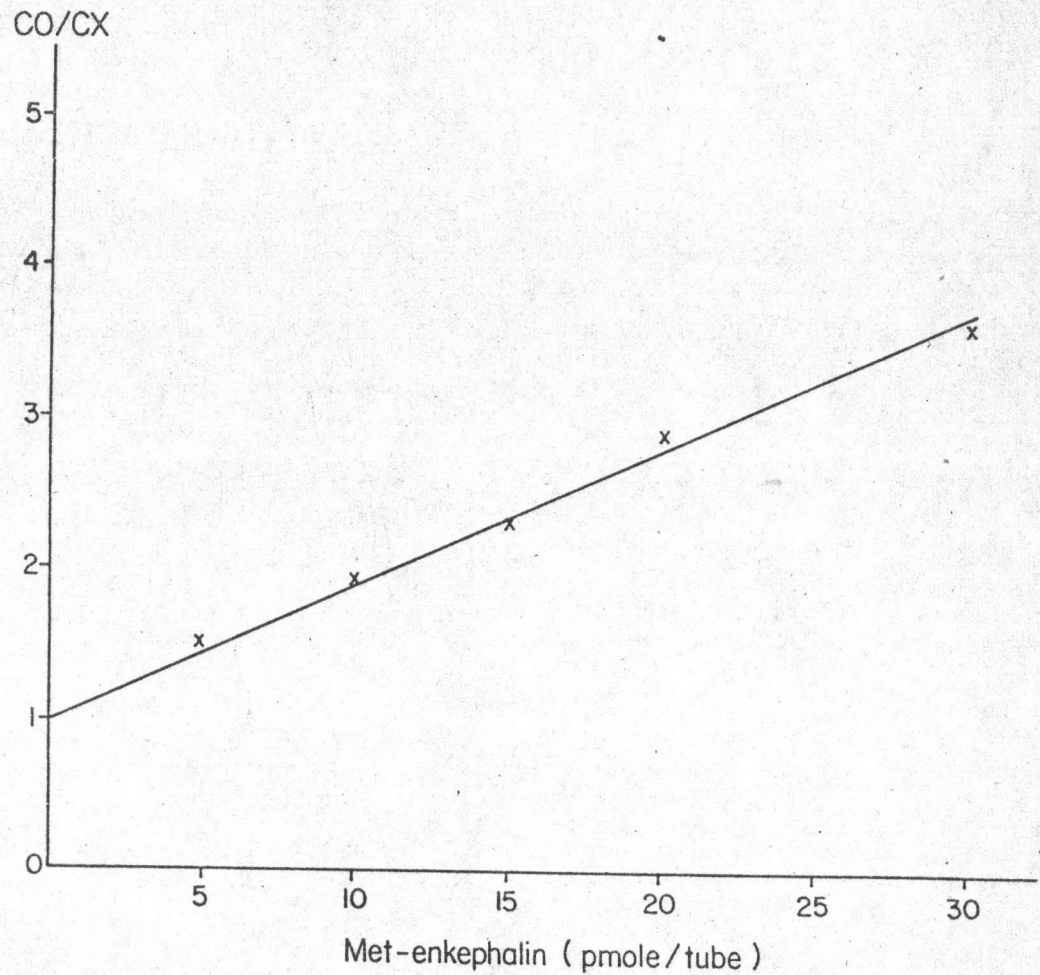


รูปที่ 31 ผลกระทบของ met-enkephalin ต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (^3H) met-enkephalin กับ receptor protein

Incubation Mixture

Receptor protein 2.5 mg Bacitracin 118.8 μg
 ^3H -met-enkephalin 0.67 nM. Met-enkephalin 10^{-11} - 10^{-6} M.
 or Morphine HCl 10^{-5} M

Incubate in 50 mM. tris-HCl buffer pH 7.7 2 ml at 25°C 25 min.



รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานของการวัด ปริมาณ met-enkephalin

Incubation Mixture

Receptor protein 2.5 mg Bacitracin 118.8 μg

^3H -met-enkephalin 0.67 nM

Met-enkephalin 5, 10, 15, 20, 30 pmole/tube or morphine HCl 10^{-5}M

Incubate in 50 nM tris-HCl buffer 2 ml at 25°C 25 min.

Stereospecific binding = Binding เมื่อมีหรือไม่มี met-enkephalin-

Binding เมื่อมี morphine 10^{-5}M

$$\frac{C_o}{C_x} = \frac{\text{Stereospecific binding เมื่อไม่มี met-enkephalin}}{\text{Stereospecific binding เมื่อมี met-enkephalin.}}$$

ตารางที่ 9 ระดับเอ็นเคฟาลิน ในแต่ละส่วน ของสมองหนูปกติ

ส่วนของสมอง	ระดับเมทไฮโอนีน เอ็นเคฟาลิน (พิโคโมล/กรัมสมอง)
Cortex	1219 \pm 211
Thalamus & Hypothalamus	2613 \pm 296
Mid brain	1966 \pm 288
Pon & Medulla	1923 \pm 305
Cerebellum	691 \pm 114

แสดงค่า Mean \pm S.D. เมื่อใช้หนูทดลอง 6 ตัว

ค่า Bound คือ ค่ากัมมันตรังสีที่นับได้จากการจับกันระหว่าง ^3H -เมทไอโอนีน เอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน (วัดจากส่วนตะกอน)

ค่า Free คือ ค่ากัมมันตรังสี ที่เหลือจากการจับกัน ซึ่งหาได้จากค่ากัมมันตรังสีที่ใช้ทั้งหมด (Total) หักลบด้วยค่ากัมมันตรังสีที่วัดได้จากการจับกัน (Bound)

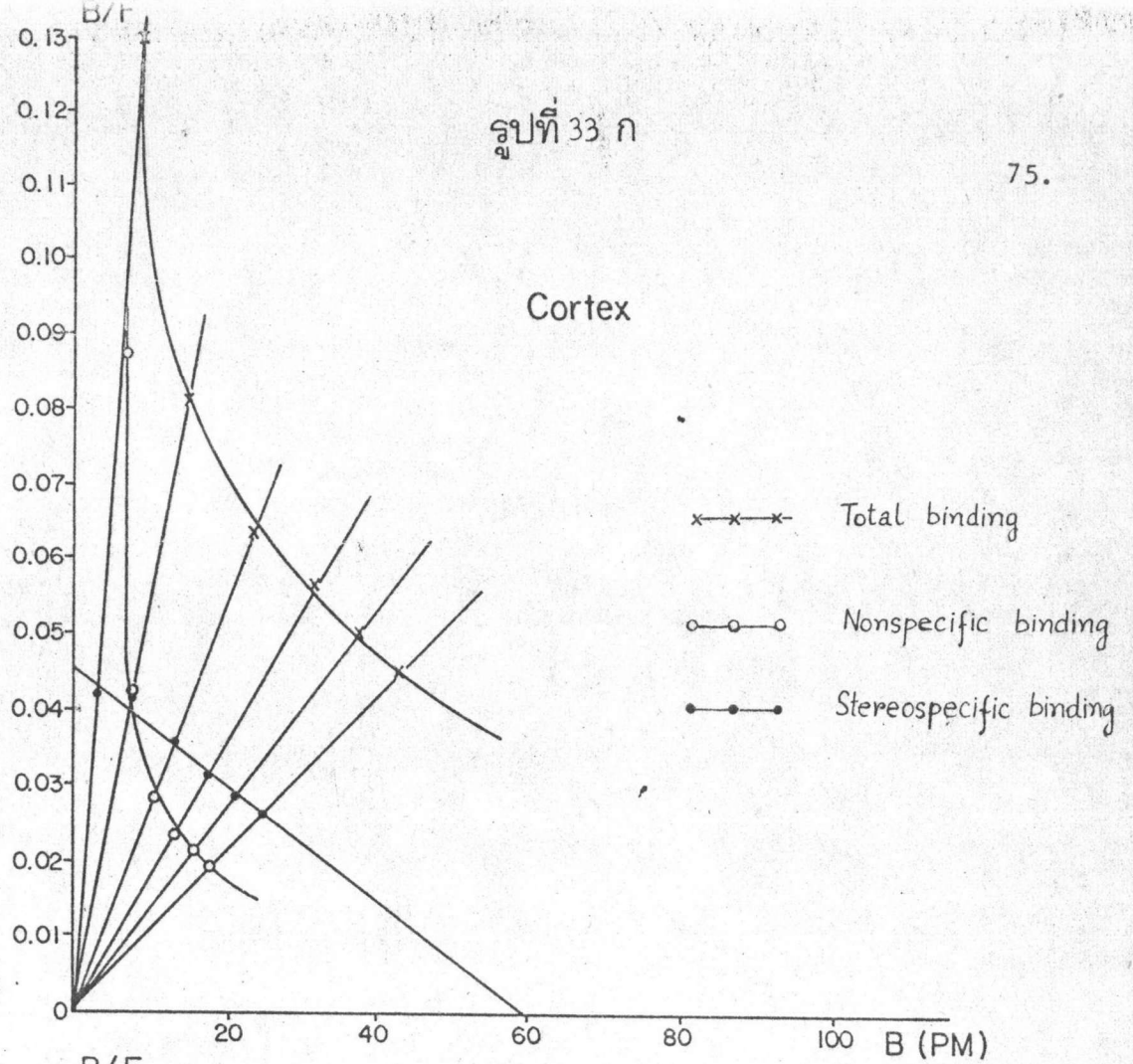
กราฟแต่ละรูปแสดง การ พล็อต ทั้ง Total binding, nonspecific binding และ stereospecific binding ซึ่งได้จากหักลบค่า nonspecific binding ออกจากค่า total binding

4.6.1 ผลการหาระดับรีเซพเตอร์ของเมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน

จากตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่าในแต่ละส่วนของสมองหนูปกติและหนูตัดยา จะมีระดับรีเซพเตอร์ของเมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลินไม่เท่ากัน สำหรับหนูปกติ สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus มีรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลินมากที่สุด (0.047 ± 0.011 พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน) รองลงมาคือ Cortex, Mid brain มีระดับรีเซพเตอร์ใกล้เคียงกัน และสูงกว่า Pon & Medulla ในขณะที่สมองส่วน Cerebellum จะมีระดับรีเซพเตอร์ต่ำที่สุดเพียง 0.004 ± 0.003 พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน หรือ 0.299 ± 0.233 พิโคโมล/กรัมสมอง ในหนูตัดยาด้วยค่า AD_{50} 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีระดับรีเซพเตอร์สูงที่สุดในสมองส่วน Cortex คือ 0.049 ± 0.005 และ 0.052 ± 0.007 พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน หรือ 3.195 ± 0.367 และ 4.076 ± 0.565 พิโคโมล/กรัมสมอง รองลงมาคือ Thalamus & Hypothalamus, Mid Brain และ Pon & Medulla ส่วน Cerebellum จะมีระดับรีเซพเตอร์ต่ำที่สุด คือมีค่า 0.0028 ± 0.001 พิโคโมล/มิลลิกรัมโปรตีน หรือ 0.172 ± 0.076 พิโคโมล/กรัมสมอง ในหนูตัดยา 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และ 0.002 ± 0.0003 หรือ 0.137 ± 0.028 พิโคโมล/กรัมสมอง เมื่อหนูตัดยา 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับรีเซพเตอร์ ในสมองแต่ละส่วนของหนูปกติ และตัดยาด้วยค่า AD_{50} 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในสมองส่วน Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain และ Cerebellum แต่สมองส่วน Pon & Medulla จะมีระดับรีเซพเตอร์สูงกว่าในสมองหนูปกติ อย่างมีนัยสำคัญ และจะต่างกันระหว่างหนูตัดยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับสมองส่วน Cortex นั้น เมื่อคำนวณระดับรีเซพเตอร์เป็นหน่วยพิโคโมล/กรัมสมอง จะแตกต่างจากหนูปกติ และหนูตัดยา 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของรีเซพเตอร์ของเมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ในสมองหนู

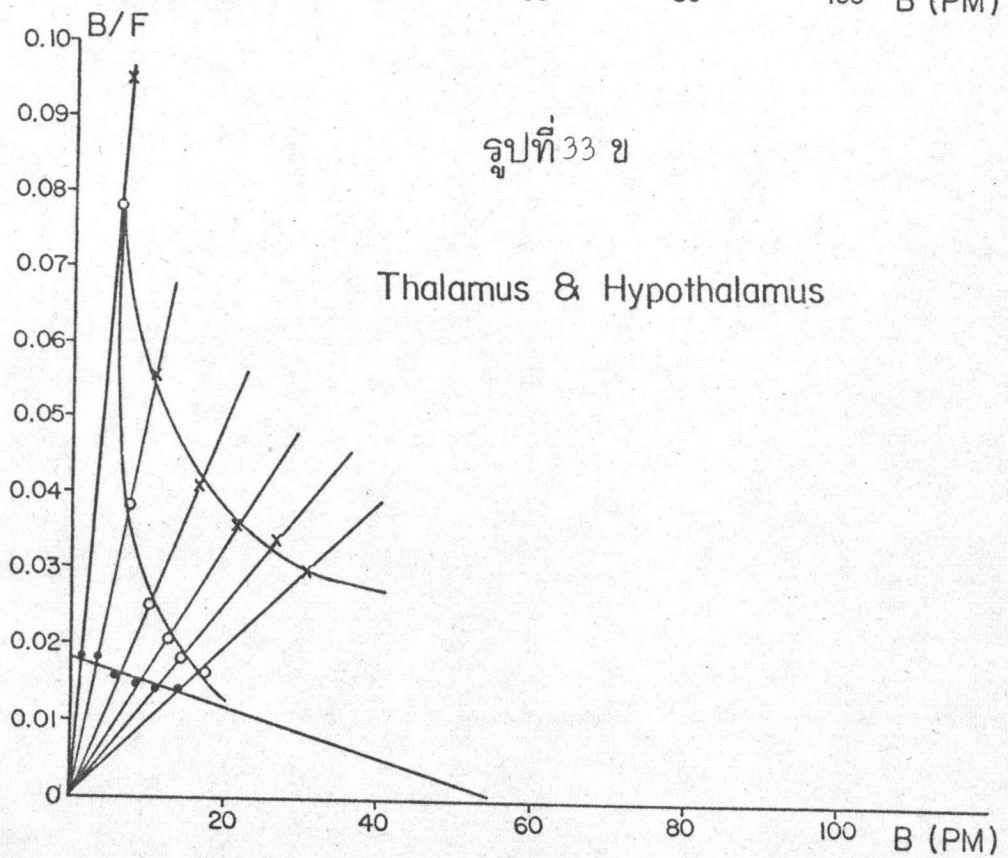
รูปที่ 33 ก

75.

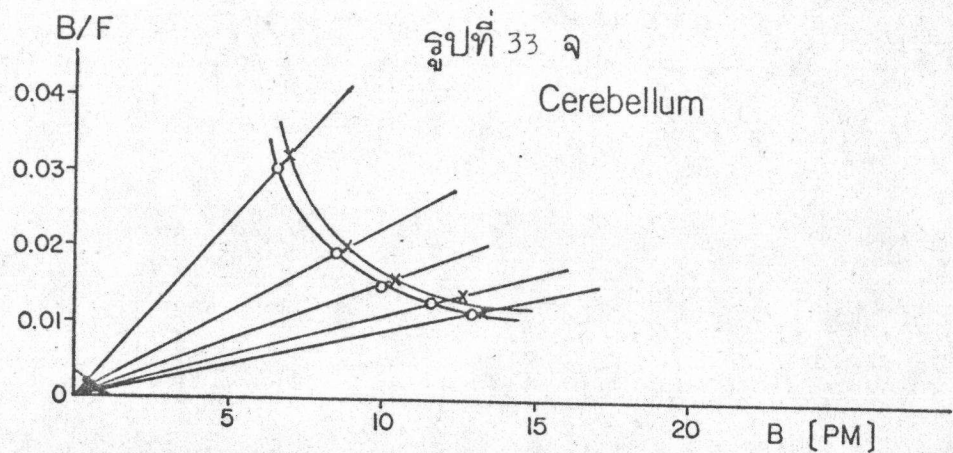
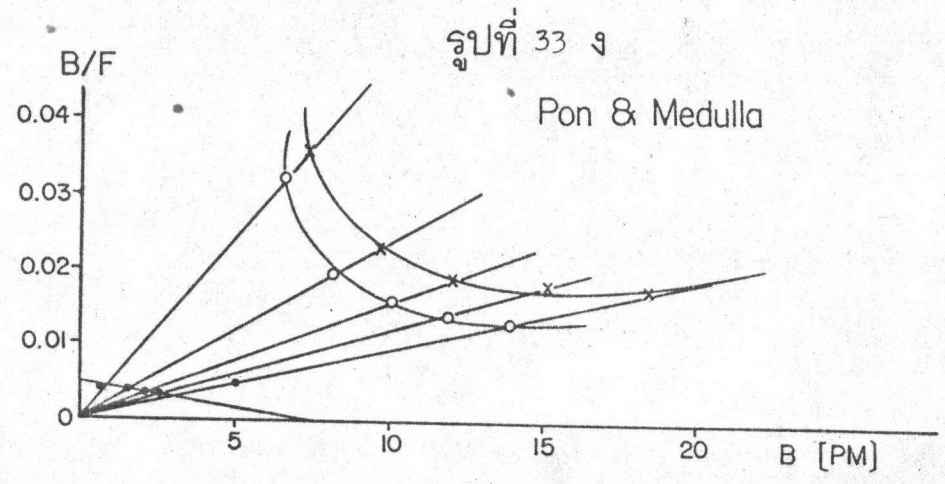
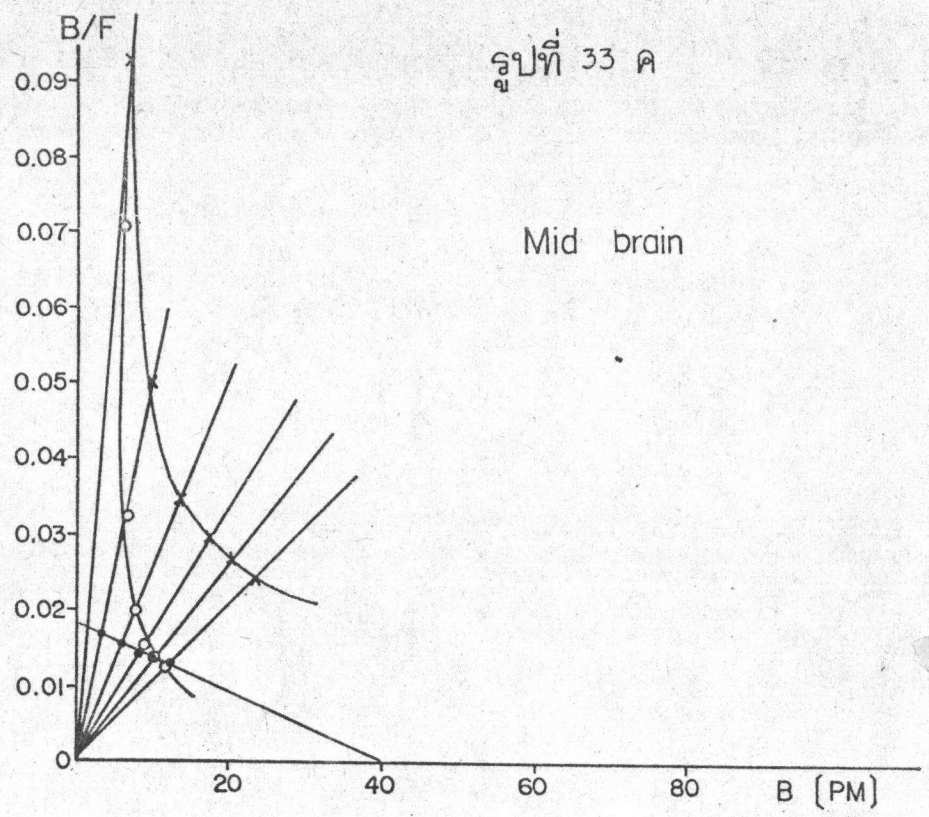


รูปที่ 33 ข

Thalamus & Hypothalamus



รูปที่ 33 ก, ข แสดงวิธีหาค่า receptor site ของเอ็นเคพาลินและค่า Kd ของการจับ



รูปที่ 33 ค,ง,จ แสดงวิธีหาค่า receptor site ของเอ็นเคฟาลินและค่า Kd ของการจับระหว่าง (^3H) met-enkephalin กับ receptor protein ในสมองส่วน Mid-brain, Pon & Medulla และ Cerebellum

ทั้งสมอง (Whole brain) โดยวัดปริมาณในสมองหนูกลุ่มละ 5 ตัว พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับรีเซพเตอร์ในสมองหนูปกติ และหนูคือยาด้วยค่า AD_{50} 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

4.6.2 ผลการศึกษาค่า dissociation constant (K_D) ของการจับกันระหว่าง 3H -เมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ในแต่ละส่วนของสมองหนูปกติและหนูติดมอร์ฟิน

จากตารางที่ 11 พบว่าที่สมองหนูปกติ และหนูติดยามอร์ฟิน จะมีความแตกต่างของค่า dissociation constant ของการจับกันระหว่าง 3H -เมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน ในสมองส่วนต่าง ๆ โดยรูปแบบดังนี้ สมองหนูปกติ ส่วน Thalamus & Hypothalamus และ Mid brain จะมีค่า dissociation constant สูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.596 ± 0.63 และ 3.372 ± 0.603 นาโนโมลาร์ รองลงมาคือ Cortex, Pon & Medulla ส่วน Cerebellum มีค่าต่ำสุดเพียง 0.717 ± 0.656 นาโนโมลาร์ เท่านั้น ในสมองหนูที่ติดมอร์ฟินด้วยค่าองศาการคือยา 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และ Cortex จะมีค่าเฉลี่ยของค่า dissociation constant ไม่ต่างกัน ส่วน Cerebellum จะมีค่าต่ำที่สุดในสมองหนูที่ติดยามอร์ฟิน ความเข้มข้น 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะพบว่าสมองส่วน Mid brain จะมีค่า dissociation constant สูงที่สุด คือ 2.212 ± 0.349 นาโนโมลาร์ รองลงมาคือสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus, Pon & Medulla และ Cortex ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วน Cerebellum มีค่า dissociation constant น้อยที่สุดเพียง 0.991 ± 0.679 นาโนโมลาร์ เท่านั้น

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบค่า dissociation constant ของการจับกันระหว่าง 3H -เมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน ในหนูติดมอร์ฟินกับหนูปกติ พบว่า เมื่อหนูติดมอร์ฟิน ความเข้มข้น 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus และ Mid brain จะมีค่า dissociation constant ต่างกับหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ ค่า dissociation constant ระหว่างหนูติดยาความเข้มข้น 32.5 กับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus จะไม่แตกต่างกัน แต่จะต่างกับในสมองส่วน Mid brain คือหนูติดยา ความเข้มข้น 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีค่า dissociation constant 2.212 ± 0.349 นาโนโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าหนูปกติ แต่สูงกว่าหนูติดมอร์ฟิน ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งมีค่า 1.556 ± 0.583 นาโนโมลาร์

ตารางที่ 10

แสดงระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลินในแต่ละส่วนของสมองหนูปกติและหนูดัดมอร์ฟินแบบเรื้อรังด้วยค่าองศาการดื้อยา (AD_{50}) 32.5 และ 300 มก./กก.นน.ตัว

ส่วนของสมอง	ระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน (พิโคโมล/มก.โปรตีน)			ระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน (พิโคโมล/กรัมสมอง)		
	หนูปกติ	องศาการดื้อยา (AD_{50}) มก./กก.นน.ตัว		หนูปกติ	องศาการดื้อยา (AD_{50}) มก./กก.นน.ตัว	
		32.5	300		32.5	300
Cortex	0.041±0.006	0.049±0.005	0.052±0.007	2.927±0.499	3.195±0.367	4.076± 0.565*
Thalamus & Hypothalamus	0.047±0.011	0.033±0.006	0.041±0.011	3.63 ±0.87	2.45 ± 0.34	3.202±0.669
Mid brain	0.03 ±0.002	0.033±0.003	0.03 ±0.006	2.838±0.317	2.998±0.50	3.06 ± 0.74
Pon & Medulla	0.0076±0.003	0.014± 0.001*	0.012±0.0008*	0.658±0.2337	1.183±0.145*	1.302± 0.283*
Cerebellum	0.004±0.0035	0.0028±0.001	0.002±0.0003	0.299±0.233	0.172±0.076	0.137±0.028
Whole Brain	0.0379±0.004	0.039±0.006	0.046±0.01			

แสดงค่า Mean ± S.D. เมื่อใช้ n = 5 สำหรับหนูปกติและหนูดื้อยา AD_{50} = 300 มก./กก.นน.ตัว และใช้ n = 4 สำหรับหนูดื้อยา AD_{50} = 32.5 มก./กก.นน.ตัว

*จำนวนรีเซพเตอร์ แตกต่างจากหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 11 แสดงค่า dissociation constant ของการจับกันระหว่างเมโทไอโอมีน เอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์ ในแต่ละส่วนของสมองหนูปกติและหนูติดมอร์ฟีนแบบ เรื้อรังด้วยค่าองศาการดีดยา (AD_{50}) 32.5 และ 300 มก./กก.นน.ตัว

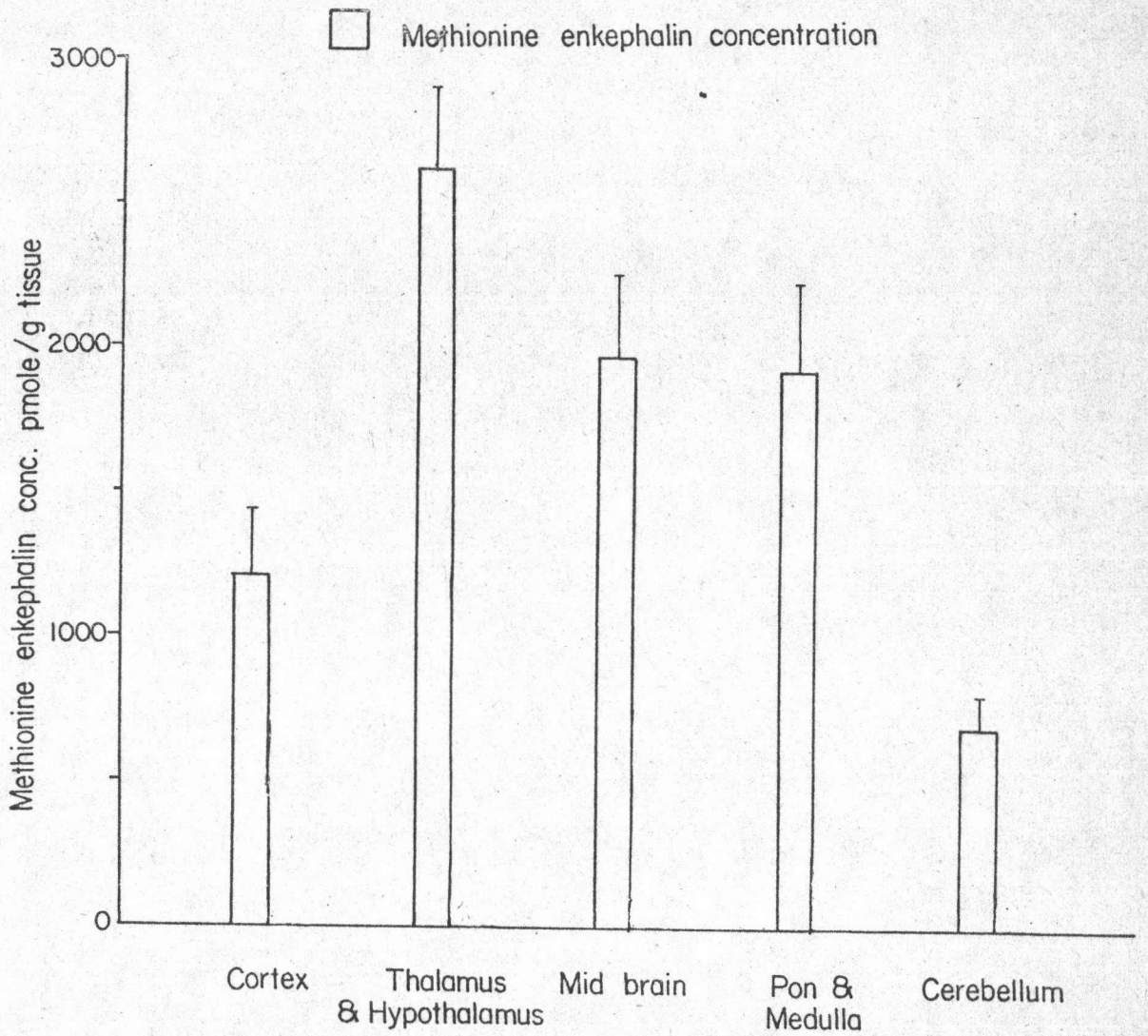
ส่วนของสมอง	dissociation constant (nM.)		
	หนูปกติ	องศาการดีดยา (AD_{50}) มก./กก.นน.ตัว	
		32.5	300
Cortex	1.80 ± 0.615	1.28 ± 0.154	1.256 ± 0.170
Thalamus & Hypothalamus	3.596 ± 0.63	$1.498 \pm 0.244^*$	$1.72 \pm 0.558^*$
Mid brain	3.372 ± 0.603	$2.212 \pm 0.349^{**}$	$1.556 \pm 0.583^{**}$
Pon & Medulla	1.453 ± 0.395	1.446 ± 0.442	1.42 ± 0.203
Cerebellum	0.717 ± 0.656	0.991 ± 0.679	0.586 ± 0.225
Whole Brain	1.494 ± 0.29	1.48 ± 0.17	1.40 ± 0.47

แสดงค่า Mean \pm S.D. เมื่อใช้ $n = 5$ สำหรับหนูปกติและหนูดีดยา AD_{50} เท่ากับ 300 มก./กก.นน.ตัว และใช้ $n = 4$ สำหรับหนูดีดยา AD_{50} เท่ากับ 32.5 มก./กก.นน.ตัว

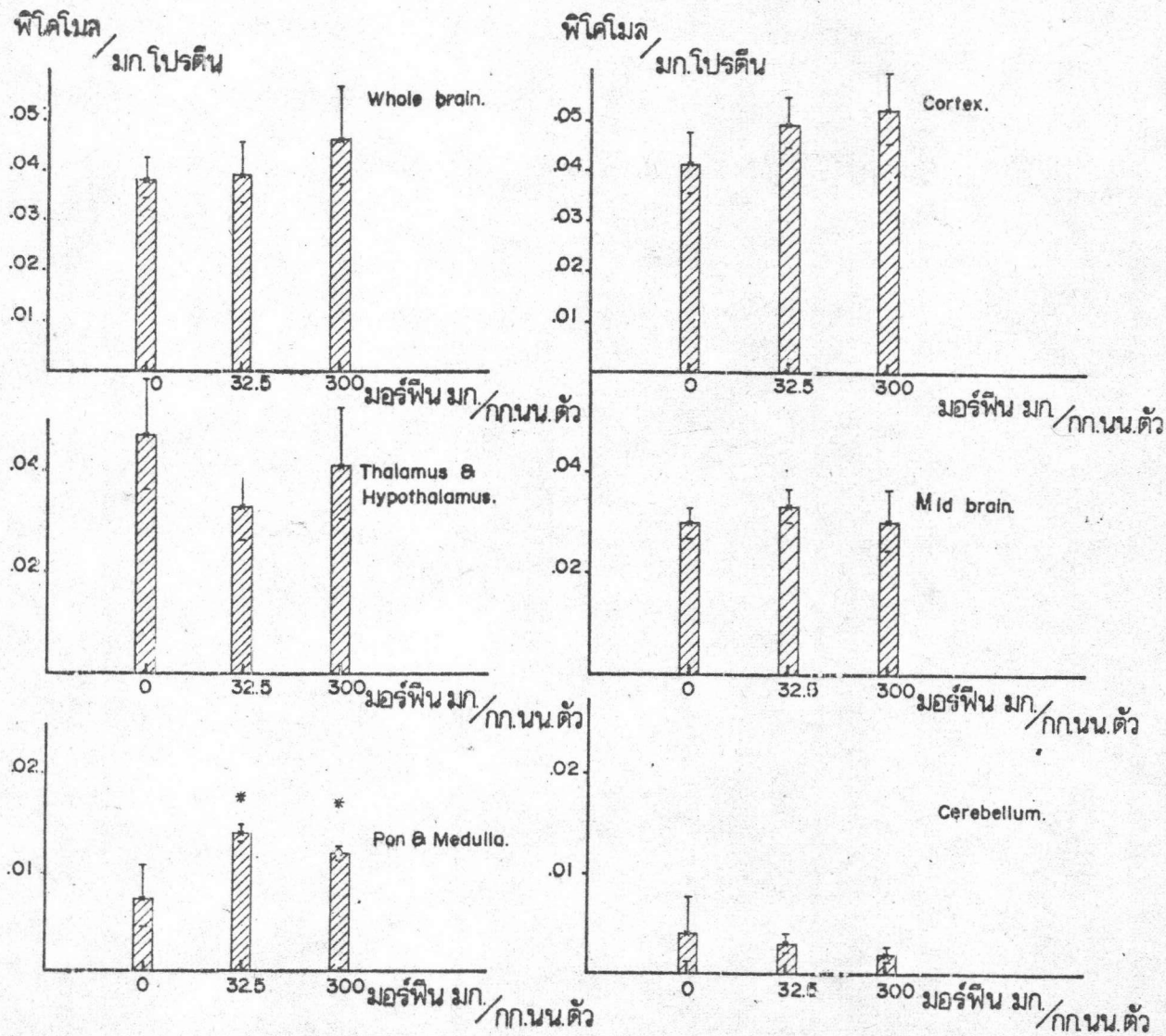
* ค่า dissociation constant แตกต่างจากหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** ค่า dissociation constant แตกต่างจากหนูปกติ และแตกต่างกันระหว่างหนูดีดยา AD_{50} 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนค่า dissociation constant ในสมองทั้งหมด
ซึ่งได้จากการทดลอง โดยใช้หนู 5 กลุ่ม ๆ ละ 1 ตัว พบว่าในหนูปกติ และหนูติด
มอร์ฟีนความเข้มข้น 300 และ 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีค่า
dissociation constant ไม่แตกต่างกัน

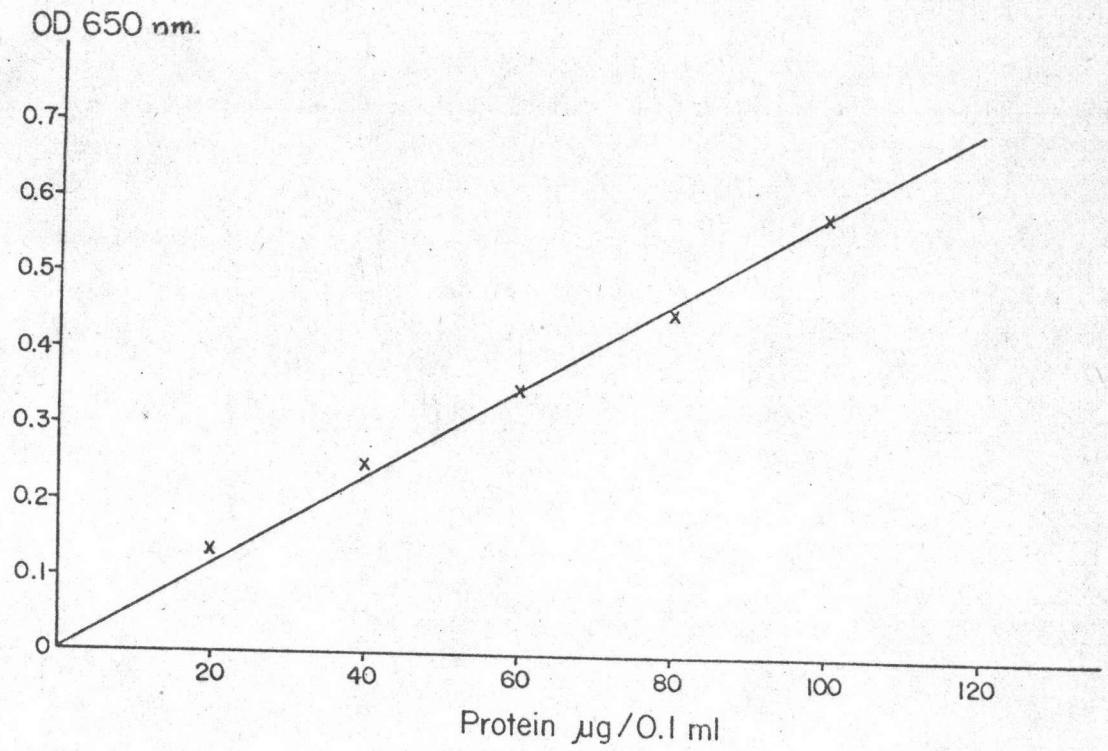


รูปที่ 34 แสดงระดับเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ในส่วนต่างๆ ของหนูปกติ



รูปที่ 35 แสดงระดับรีเซพเตอร์ ในลุ่มต่างๆของสมองหนูปกติ และหนูที่ดมอร์ฟินแบบเรื้อรัง ด้วยของค่าการคือยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม / กิโลกรัม น้ำหนักร่างกาย
 * แตกต่างกันและแตกต่างจากหนูปกติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %





รูปที่ 36 กราฟมาตรฐานในการวัด ปริมาณโปรตีนโดย Lowry method