บทที่ 4

ผลการวิจัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

1. ผลของการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์และมอร์ฟีนต่อการ response ของหางหนู

เมื่อศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างการออกฤทธิ์ของการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์กับมอร์ฟีนในหนูทดลองโดยดูการ response ของหางหนูเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อน ตามวิธีการทดลอง ข้อ 3.1 ได้ผลดังตารางที่ 4 จะเห็นว่าก่อนฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนูเท่ากับ 2.0 ± 0.7 วินาที และเมื่อฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์เข้าไปปริมาตร 0.5 มล. แล้วจับเวลาการกระดิกของหางที่ช่วงเวลาต่างๆหลังจากฉีด คือ 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 นาที พบว่าค่าเฉลี่ยเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนูอยู่ในช่วง 2.0 ± 0.7 ถึง 2.3 ± 1.0 วินาที แสดงว่า 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ไม่มีผลต่อการ response ของหางหนูในช่วงเวลาที่ทดลอง

เมื่อทดสอบการ response ในหนูทดลองจำนวน 10 ตัว พบว่าก่อนฉีดมอร์ฟีน เวลาที่หางหนูมีการ response ปกติ คือ 1.8 ± 0.7 วินาที (ตารางที่ 5) หลังจากฉีดมอร์ฟีนจำนวน 10 มก./กก. น้ำหนักตัว แล้ววัดการ response ของหางหนูหลังจากฉีดในช่วงเวลา 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 นาที พบว่ามอร์ฟีนจะออกฤทธิ์การระงับปวดในหนูทั้ง 10 ตัวได้เร็วไม่เท่ากัน บางตัวจะออกฤทธิ์เร็ว (หนูตัวที่ 1, 7, 9) บางตัวจะออกฤทธิ์ช้า (หนูตัวที่ 2, 3, 4, 5, 6, 8 และ 10) อย่างไรก็ตามมอร์ฟีนจะออกฤทธิ์ในการระงับปวดอย่างสมบูรณ์ (หางหนูจุ่มในน้ำร้อนได้นานตั้งแต่ 10 วินาทีขึ้นไป) ในหนูทั้ง 10 ตัว หลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปแล้วในช่วงเวลา 40-60 นาที และฤทธิ์มอร์ฟีนเกือบจะหมดไปหลังจากฉีดนาน 140 นาที แสดงว่ามอร์ฟีนที่ฉีดเข้าไปจะมีผลต่อการ response ของหนูโดยไปเพิ่มเวลาที่ทำให้หางหนูเกิดการกระดิก

ตารางที่ 4 การ response ของหางหนูในช่วงเวลาต่างๆกันหลังจากฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์เข้าใต้ผิวหนัง จำนวน 0.5 มล.

หนู ตัวที่	น้ำหนักหนู (กรัม)	ระยะเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนู (วินาที)*								
		ก่อนฉีด 0.85% NaCl	หลังจากฉีด 0.85% NaCl							
			10 นาที	20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที	140 นาที
1	230	2.0	2.5	3.0	2.5	2.0	2.0	2.0	3.0	2.5
2	248	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	1.0
3	230	2.2	2.0	3.0	3.0	2.0	3.0	1.0	1.0	2.0
4	237	3.0	4.0	2.0	3.0	3.0	2.0	2.0	3.0	2.0
5	270	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.5	1.0	3.0	2.0
6	273	1.5	1.5	1.0	1.5	2.0	1.5	2.5	1.0	2.0
7	246	3.0	3.0	2.0	2.5	3.0	2.0	2.0	3.0	3.0
8	260	1.5	2.5	2.5	3.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0
9	230	2.0	3.5	1.5	2.0	2.0	1.0	3.0	1.5	3.0
10	243	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	1.5	2.0	2.0
MEAN ±S.D.	-	2.0±0.7	2.3±1.0	2.1±0.6	2.2±0.6	2.2±0.4	2.0±0.5	2.0±0.7	2.2±0.9	2.1±0.6

* เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 2 ครั้ง

2. ผลของการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์และมอร์ฟีนทุกๆวันต่อการ response ของหางหนูเมื่อกระตุ้นด้วยความร้อน

ตารางที่ 6 แสดงถึงผลของการทดลองเมื่อนำหนูทั้ง 10 ตัว มาทำการทดสอบโดยทดสอบก่อนได้รับการฉีดกับหลังจากฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และวัดการ response ที่ช่วงเวลาต่างๆคือ 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที และทำการทดสอบซ้ำกันเช่นนี้ติดต่อกันเป็นเวลาถึง 4 วัน พบว่าการ response ของหนูเมื่อวัดในแต่ละวันก่อนฉีดกับหลังจากฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ทำการทดสอบทางสถิติจากค่าเฉลี่ยเวลาการกระดิกของหางหนู โดยใช้ analysis of variance) ไม่ว่าจะวัดที่ช่วงเวลาใดๆ และการresponse ของหางหนูในช่วงเวลาเดียวกันของวันที่ 1, 2, 3 และ 4 ก็ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการฉีด0.85% โซเดียมคลอไรด์ ติดต่อกัน 4 วัน จะไม่มีผลต่อการ response ของหางหนู

ตารางที่ 7, ตารางที่ 8 และตารางที่ 9 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงการ response ของหางหนูในหนูทดลอง 3 กลุ่ม (กลุ่มละ 10 ตัว)เมื่อได้รับการฉีดมอร์ฟีนปริมาณ 5, 8 และ 10 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน

ตารางที่ 7 เมื่อฉีดมอร์ฟีนปริมาณ 5 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกัน 4 วัน ในแต่ละวันทดสอบการ response ของหางหนูก่อนฉีดกับหลังจากฉีดมอร์ฟีนที่ช่วงเวลา 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 นาที การ response เมื่อแสดงด้วยค่าเปอร์-เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia* ในวันแรกของการฉีดพบว่ามีค่าเท่ากับ 40% และ 30% เมื่อวัดที่ช่วงเวลา 40 และ 60 นาที หลังจากฉีดมอร์ฟีน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่จำนวนหนูทดลองเกิด complete analgesia มากที่สุด เมื่อฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ในวันที่ 2, 3 และ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด

---

* จำนวนหนูที่ไม่กระดิกหาง (response) ภายในเวลา 10 วินาที เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อน 58 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส โดยเทียบให้หนูทั้งหมดเป็นร้อย

ตารางที่ 5 การ response ของหางหนูในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากฉีดมอร์ฟีนจำนวน 10 มก./กก. น.น. ตัว เข้าใต้ผิวหนัง จำนวน 0.5 มล.

หนูตัวที่	น้ำหนักหนู (กรัม)	ระยะเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนู (วินาที)*								
		ก่อนฉีดมอร์ฟีน	หลังจากฉีดมอร์ฟีน							
			10 นาที	20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที	140 นาที
1	230	1.5	>10.0	> 10.0	>10.0	>10.0	> 10.0	>10.0	>10.0	7.0
2	250	2.5	5.0	10.0	>10.0	>10.0	10.0	7.0	4.0	2.0
3	230	1.0	5.0	6.0	>10.0	>10.0	7.0	3.0	1.5	1.0
4	240	2.0	3.0	6.0	>10.0	>10.0	7.0	3.0	2.0	1.0
5	270	1.0	6.0	> 10.0	>10.0	>10.0	>10.0	3.0	2.0	2.5
6	265	1.5	3.5	4.0	>10.0	10.0	4.0	3.0	2.0	2.0
7	255	3.0	>10.0	> 10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	7.0	5.0
8	260	2.0	3.5	8.0	10.0	>10.0	3.0	2.0	3.0	2.0
9	235	1.0	>10.0	> 10.0	>10.0	>10.0	>10.0	5.0	2.0	2.0
10	250	1.5	6.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	2.0	2.0

ค่าเฉลี่ยปกติของการกระดิกของหางหนู 1.8 ± 0.7 วินาที

* เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 2 ครั้ง ยกเว้นหนูที่ใช้เวลาของการกระดิกหาง ≥ 10 วินาที (complete analgesic response) จะทำการทดสอบ 1 ครั้ง

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการ response ของหางหนูก่อนฉีดและหลังฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ในวันและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

วันที่** ของการฉีด	ระยะเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนู (วินาที)*							
	ก่อนฉีด 0.85% NaCl	หลังจากฉีด 0.85% NaCl						
		10 นาที	20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที
1	2.0±0.7	2.3±1.0	2.1±0.6	2.2±0.6	2.2±0.4	2.0±0.5	2.0±0.7	2.2±0.9
2	1.8±0.4	1.7±0.3	1.7±0.4	1.9±0.3	1.6±0.5	1.8±0.5	1.6±0.6	1.7±0.5
3	1.9±0.6	1.8±0.6	1.7±0.5	1.6±0.5	1.8±0.3	1.8±0.4	1.9±0.6	1.8±0.4
4	2.1±0.5	1.9±0.4	2.2±0.6	2.1± 0.5	2.2±0.7	1.8±0.6	2.0±0.3	2.0±0.3

* แสดง MEAN ± S.D. เมื่อใช้จำนวนหนูทดลอง 10 ตัว

** ฉีด 0.85% NaCl ปริมาตร 0.5 มล. เข้าใต้ผิวหนังวันละ 1 ครั้ง

complete analgesia ที่ช่วงเวลาใดๆก็ตามจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ ดังจะเห็นได้จากการ response ที่เวลา 40 นาที หลังจากฉีดมอร์ฟีนจะมีค่า 40% ในวันแรก, 10% ในวันที่ 2 และจะลดลงเป็นศูนย์ในวันที่ 3 และ 4 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการฉีดมอร์ฟีนปริมาณคงที่เข้าไปในหนูทดลองติดต่อกัน 4 วันทำให้ฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวดลดลง

ตารางที่ 8 และตารางที่ 9 แสดงถึงผลการทดลองเช่นเดียวกับตารางที่ 7 โดยเพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 8 และ 10 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นอีกครั้งหนึ่งว่าช่วงเวลาที่ทำให้จำนวนหนูทดลองเกิด complete analgesia มากที่สุดคือ 40-60 นาที และค่าเปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia จะค่อยๆลดลงเมื่อฉีดมอร์ฟีนปริมาณคงที่ติดต่อกัน

3. ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีนต่อการเกิด analgesic response

จากผลการทดลองในตารางที่ 10 เมื่อให้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนเป็น 3, 5, 8 และ 10 มก./กก.น้ำหนักตัว พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia ไม่ว่าจะวัดที่ช่วงเวลาใดๆก็ตามจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของมอร์ฟีนเพิ่มขึ้น เช่นที่ช่วงเวลาหลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 และ 60 นาที ค่าเปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia จะค่อยๆเพิ่มเป็น 0, 40, 60 และ 100 กับ 0, 30, 70,100 ที่ความเข้มข้นของมอร์ฟีน 3, 5, 8 และ 10 มก./กก.น้ำหนักตัว และค่าเปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia มากที่สุดในช่วง 40-60 นาที ที่ทุกๆความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ทดลอง

4. ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีนต่อการเกิด analgesic response ในหนูทดลองที่ดื้อยา

เพื่อต้องการที่จะศึกษาถึงลักษณะและรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูที่พัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนแล้ว การทดลองนี้จึงต้องทำให้หนูดื้อยาเสียก่อนโดยใช้หนูทดลอง 30 ตัวฉีดมอร์ฟีนจำนวน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้งห่างกัน 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบผลการฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก. น.น. ตัว/วัน ต่อการเกิด analgesic response ในวันและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

วันที่* ของการฉีด	ระยะเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนูก่อนฉีดมอร์ฟีน (วินาที)**	เปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia***						
		20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที	140 นาที
1	2.2 ± 0.5	10	40	30	10	0	0	0
2	1.8 ± 0.6	0	10	0	0	0	0	0
3	2.1 ± 0.7	0	0	0	0	0	0	0
4	2.2 ± 0.4	0	0	0	0	0	0	0

* ฉีดมอร์ฟีนปริมาตร 0.5 มล. เข้าใต้ผิวหนังวันละ 1 ครั้ง

** แสดงค่า MEAN ± S.D. เมื่อใช้จำนวนหนูทดลอง 10 ตัว

*** จำนวนหนูที่ไม่มีการ response เกิดขึ้นใน 10 วินาที เมื่อเทียบจำนวนหนูเป็นร้อย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลของการฉีดมอร์ฟีน 8 มก./กก. น.น.ตัว/วัน ต่อการเกิด analgesic response ในวันและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

วันที่ * ของการฉีด	ระยะเวลาที่เกิดการกุระดิกของหางหนูก่อนฉีดมอร์ฟีน (วินาที) **	เปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia ***						
		20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที	140 นาที
1	1.9 ± 0.4	30	60	70	30	10	0	0
2	2.5 ± 0.6	10	30	30	10	10	0	0
3	2.6 ± 0.6	0	0	0	0	0	0	0
4	2.4 ± 0.6	0	0	0	0	0	0	0

* ฉีดมอร์ฟีนปริมาตร 0.5 มล. เข้าใต้ผิวหนังวันละ 1 ครั้ง

** แสดงค่า MEAN ± S.D. เมื่อใช้จำนวนหนูทดลอง 10 ตัว

*** จำนวนหนูที่ไม่มีการ response เกิดขึ้นใน 10 วินาที เมื่อเทียบจำนวนหนูเป็นร้อย

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบผลการฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก. น.น. ตัว/วัน ต่อการเกิด analgesic response ในวันและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

วันที่ของการฉีด*	ระยะเวลาที่** เกิดกุรกระดิก-หางกอนฉีดมอร์-ฟีน (วินาที)	เปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia***						
		20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที	140 นาที
1	1.8 ± 0.7	50	100	100	60	30	10	0
2	2.8 ± 0.8	22	55	55	44	22	11	0
3	2.8 ± 0.9	0	22	22	0	0	0	0
4	2.7 ± 1.0	0	11	0	0	0	0	0

* ฉีดมอร์ฟีนปริมาตร 0.5 มล. เข้าใต้ผิวหนัง วันละ 1 ครั้ง

** แสดงค่า MEAN ± S.D.

*** จำนวนหนูที่ไม่มีการ response เกิดขึ้นใน 10 วินาที เมื่อเทียบจำนวนหนูเป็นร้อย

ผลการทดลองในวันที่ 1 ได้จากการใช้หนูจำนวน 10 ตัว

ผลการทดลองในวันที่ 2, 3, 4 ได้จากการใช้หนู 9 ตัว

จนครบ 3 วัน พบว่าในวันที่ 3 ของการฉีด หางหนูจะมีการ response ปกติ แสดงว่าหนูเกิดการดื้อยา 5 มก./กก.น้ำหนักตัว แล้วจึงแบ่งหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม นำแต่ละกลุ่มมาเพิ่มความเข้มข้นของมอร์ฟีนให้เป็น 8, 10 และ 12 มก./กก.น้ำหนักตัว เมื่อทดสอบการ response ของหางหนูก่อนฉีดกับหลังจากฉีดมอร์ฟีนในช่วงต่างๆกัน คือ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 นาที (ตามตารางที่ 11) พบว่าก่อนฉีดมอร์ฟีนหางหนูมีการ response อย่างปกติ หลังจากฉีดมอร์ฟีนแล้วค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของมอร์ฟีนไม่ว่าจะวัดที่ช่วงใดๆก็ตาม และค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesiaจะมากที่สุดในช่วง 40 และ 60 นาที ซึ่งสอดคล้องกับผลของมอร์ฟีนในหนูที่ไม่ดื้อยา (ตารางที่ 10) จากรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้วิธีการทดสอบนี้วัดการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวด ค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia มากที่สุด ในช่วง 40-60 นาที ทั้งในหนูก่อนพัฒนาการดื้อยากับหลังพัฒนาการดื้อยา

5. <u>ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของมอร์ฟีนในซีรั่มและสมองหนูกับการเกิด analgesic response</u>

หลังจากฉีดมอร์ฟีนจำนวน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนังในหนูทดลอง 7 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว วัดการเกิด analgesic response ,วัดปริมาณมอร์ฟีนในสมอง และปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มที่ช่วงเวลาหลังจากฉีด 5, 20, 40, 60, 120, 180 และ 360 นาที จากผลการทดลองในตารางที่ 12 และรูปที่ 10 พบว่าหนูจะเกิด analgesic response มากกว่า 10 วินาทีที่ช่วง 40, 60 และ 120 นาที และการ response จะกลับสู่ภาวะปกติที่เวลา 6 ชั่วโมง เมื่อวัดปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมองโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ พบว่าระดับมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมองของหนูที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีนจะเพิ่มขึ้นมากที่สุดในช่วง 40 และ 60 นาที หลังจากนั้นจะค่อยๆลดลงและที่เวลา 6 ชั่วโมง ระดับมอร์ฟีนในสมองลดลงจนกระทั่งวัดไม่ได้ ส่วนในซีรั่มปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้จะมีค่าน้อยมาก จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะและรูปแบบ

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีน ต่อการเกิด analgesic response

ความเข้มข้น* ของมอร์ฟีน (มก./กก.น.น.หนู)	ระยะเวลาที่เกิด** การกระดิกของหาง หนูกอนฉีดมอร์ฟีน (วินาที)	เปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia***						
		20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที	140 นาที
3	1.9 ± 0.4	0	0	0	0	0	0	0
5	2.2 ± 0.5	10	40	30	10	0	0	0
8	1.9 ± 0.4	30	60	70	30	10	0	0
10	1.8 ± 0.7	50	100	100	60	30	10	0

* แต่ละความเข้มข้นของมอร์ฟีน ใช้หนูจำนวน 10 ตัว

** แสดงค่า MEAN ± S.D.

*** จำนวนหนูที่ไม่มีการ response เกิดขึ้นใน 10 วินาที เมื่อเทียบจำนวนหนูเป็นร้อย

ตารางที่ 11 ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีนต่อการเกิด analgesic response ในหนูทดลองที่ฉีดยามอร์ฟีน*

ความเข้มข้นของมอร์ฟีน (มก./กก.น.น.ตัว)	ระยะเวลาที่เกิดการรุกระดิกของหางหนูกอนฉีดมอร์ฟีน (วินาที)**	เปอร์เซ็นต์ของหนูที่เกิด complete analgesia***						
		20 นาที	40 นาที	60 นาที	80 นาที	100 นาที	120 นาที	140 นาที
8	1.7 ± 0.4	20	40	30	10	0	0	0
10	1.8 ± 0.3	30	60	30	10	0	0	0
12	1.9 ± 0.4	70	90	80	80	30	10	0

* โดยการฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น.น. ตัว เข้าใต้ผิวหนังวันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน

** แสดงค่า MEAN ± S.D. เมื่อใช้หนูจำนวน 10 ตัว

*** จำนวนหนูที่ไม่มีการ response เกิดขึ้นใน 10 วินาที เมื่อเทียบจำนวนหนูเป็นร้อย

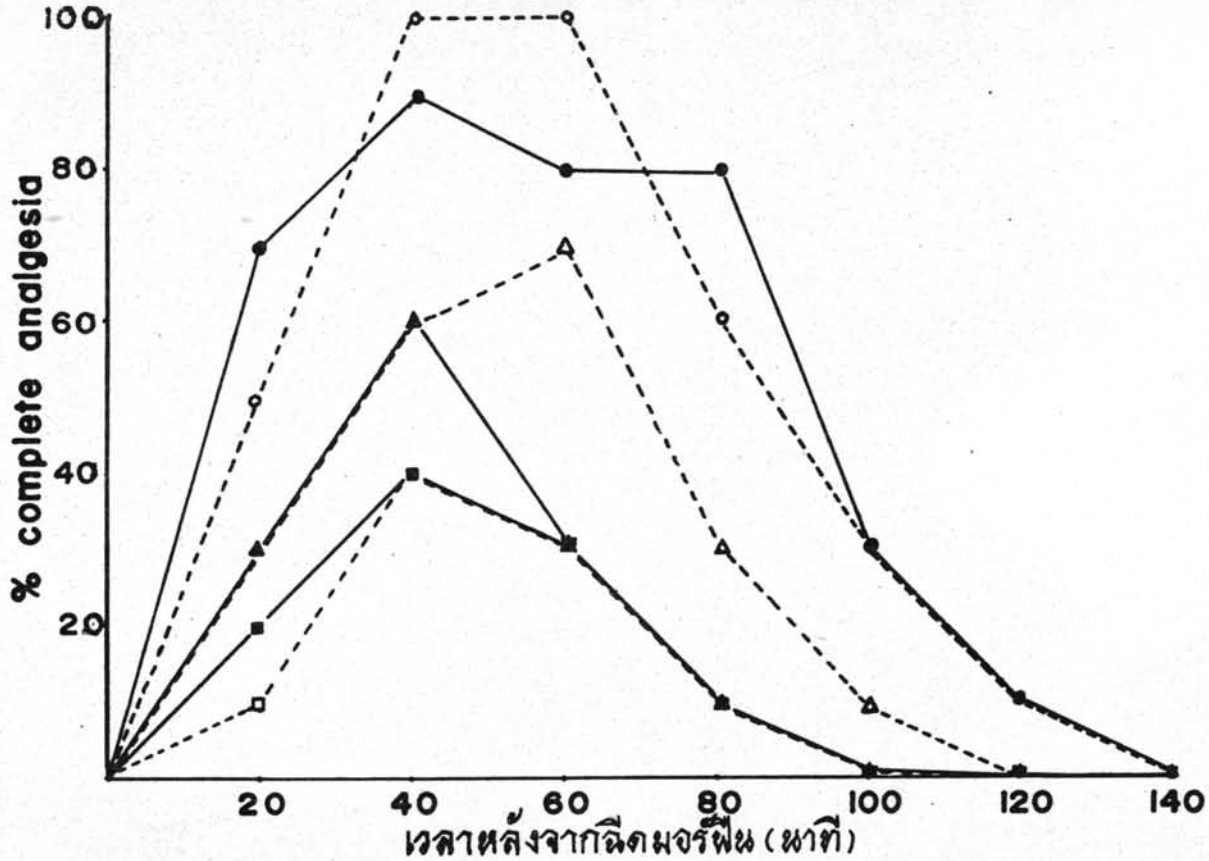
ของการเกิด analgesic response จะสัมพันธ์กับปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมอง คือค่า analgesic response ที่วัดได้จากการ response ของหางหนูและระดับของมอร์ฟีนในซีรั่มกับในสมองจะมีค่าสูงสุดที่ช่วงเวลา 40 และ 60 นาที และ analgesic response จะลดลงเมื่อระดับมอร์ฟีนในซีรั่มกับในสมองลดลง ในตารางเดียวกันนี้แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณมอร์ฟีนในสมองกับปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อให้เวลาหลังจากฉีดมอร์ฟีนนานขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่ชี้แนะว่ามอร์ฟีนในสมองอาจจะถูกกำจัดออกไปได้ช้ากว่ามอร์ฟีนในซีรั่ม

6. <u>การกระจายของมอร์ฟีนในส่วนต่างๆของสมองหนูที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีน</u>

จากผลการทดลองในตารางที่ 13 เมื่อทำการฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลอง และวัดระดับมอร์ฟีนในส่วนต่างๆของสมองทั้ง 5 ส่วนคือ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain, cerebellum และ pons + medulla โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที พบว่าระดับมอร์ฟีนมีมากที่สุดใน thalamus + hypothalamus และ cerebellum รองลงมาคือ pons + medulla พบน้อยที่สุดในบริเวณ midbrain และ cortex

7. <u>การทำให้หนูทดลองพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีน</u>

จากผลการทดลองในรูปที่ 11 แสดงให้เห็นถึงการเกิดการดื้อยามอร์ฟีนและองศาของการดื้อยา เมื่อเพิ่มปริมาณมอร์ฟีนด้วยขนาดของค่า AD_{50} หนูกลุ่มที่ 1 ซึ่งไม่เคยถูกฉีดมอร์ฟีนมาก่อนเลยมีค่า AD_{50} 5 มก./กก.น้ำหนักตัว เมื่อหนูกลุ่มที่ 2 ได้รับมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว ติดต่อกันนาน 3 วัน ในวันที่ 4 จึงนำมาหาค่า AD_{50} มีค่าเท่ากับ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว หนูกลุ่มที่ 3 ได้รับมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว 3 วัน ในวันที่ 4 เพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว และฉีดต่อไปจนครบ 4 วัน ในวันที่ 8 จึงนำมาหาค่า AD_{50} ได้ 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว หนูกลุ่มที่ 4 ได้รับการฉีดมอร์ฟีนเช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ 3 แต่ในวันที่ 8



รูปที่ 9 แสดงถึงรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูก่อนพัฒนาการดื้อยา กับหลังพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีน

หนูก่อนพัฒนาการดื้อยา

- มอร์ฟีน 5 มก./กก.น.น.ตัว
- มอร์ฟีน 8 มก./กก.น.น.ตัว
- มอร์ฟีน 10 มก./กก.น.น.ตัว

หลังพัฒนาการดื้อยา 5 มก./กก.น.น.ตัว

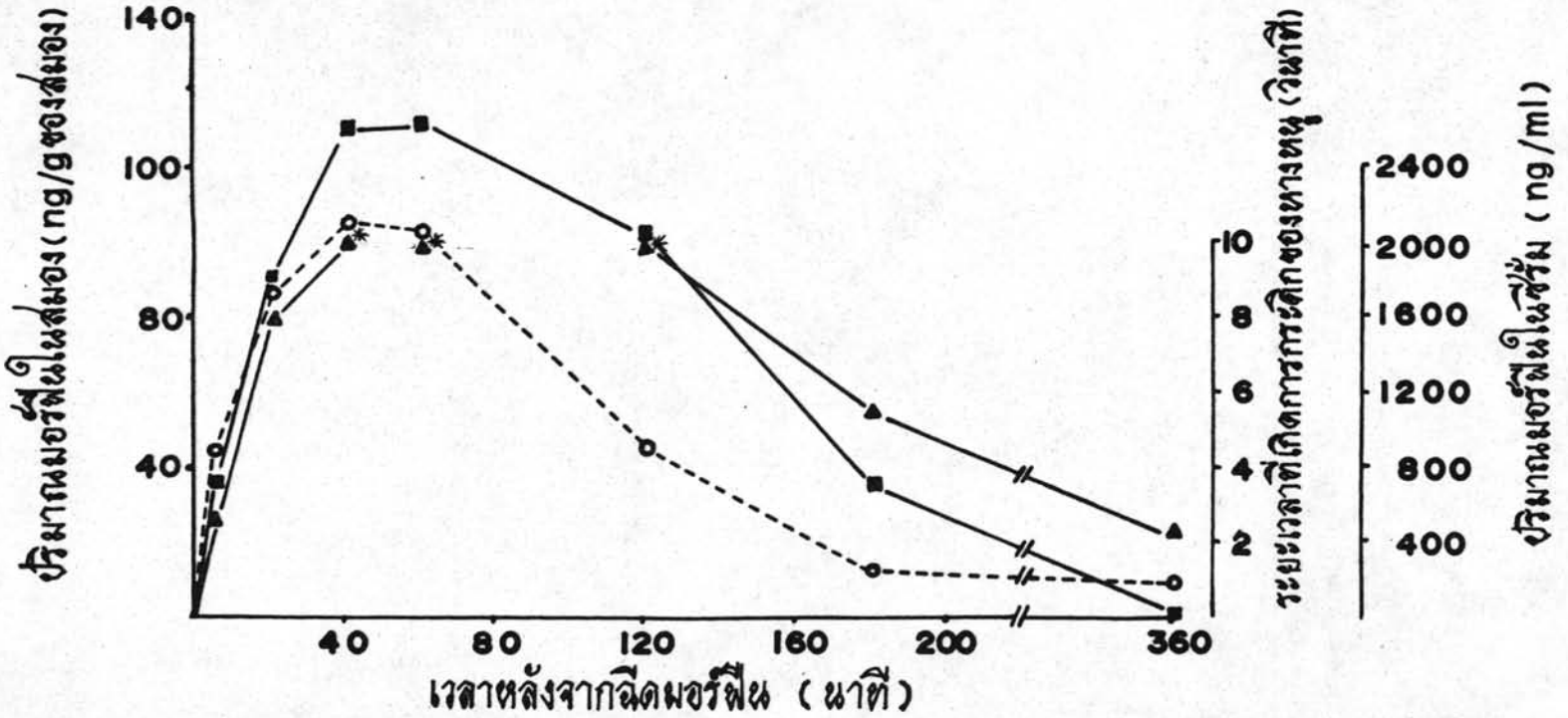
- มอร์ฟีน 8 มก./กก.น.น.ตัว
- มอร์ฟีน 10 มก./กก.น.น.ตัว
- มอร์ฟีน 12 มก./กก.น.น.ตัว

ตารางที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณมอร์ฟีนในซีรัมและในสมองของหนูทดลองกับการเกิด analgesic response

เวลาหลังจากฉีด* มอร์ฟีน (นาที)	น้ำหนักหนู** เฉลี่ย (กรัม)	ระยะเวลาที่เกิด** การกระดิกของหางหนู (วินาที)	ปริมาณมอร์ฟีน** ในสมอง (ng/g ของสมอง)	ปริมาณมอร์ฟีน** ในซีรัม (ng/ml)	ปริมาณมอร์ฟีนในสมอง / ปริมาณมอร์ฟีนในซีรัม
ควบคุม	248.0 ± 26.2	2.1 ± 0.3	0	0	0
5	283.6 ± 10.6	2.5 ± 0.5	38.3 ± 6.5	397.2 ± 109.8	0.040
20	285.0 ± 38.4	8.0 ± 1.3	91.5 ± 12.9	1713.2 ± 187.2	0.053
40	270.0 ± 27.4	>10	129.5 ± 13.6	2090.7 ± 144.0	0.062
60	271.6 ± 26.0	>10	132.0 ± 16.4	2063.8 ± 150.5	0.064
120	291.0 ± 45.9	>10	102.5 ± 10.2	1023.3 ± 226.6	0.100
180	300.0 ± 33.8	5.5 ± 2.3	35.2 ± 8.0	267.2 ± 120.0	0.132
360	293.0 ± 64.2	2.4 ± 0.1	0	217.0 ± 82.0	

* ฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก. น.น. ตัว 0.5 มล. เข้าใต้ผิวหนัง

** แสดงค่า MEAN ± SD เมื่อใช้หนูจำนวน 5 ตัว



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมองของหนูทดลอง กับการเกิด - analgesic response

ฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก.น.น.ตัว 0.5 มล. เข้าใต้ผิวหนัง จากนั้นนำสมองและเลือดจากปลายหางหนู ที่ช่วงเวลาต่างๆ หลังจากฉีด มาวัดปริมาณมอร์ฟีนโดยวิธี radioimmunoassay.

■——■ ปริมาณมอร์ฟีนในสมอง o- - - -o ปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่ม

▲——▲ ระยะเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนู

▲* ระยะเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนู >10 วินาที

เพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 12 จึงนำมาหาค่า AD_{50} ได้ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว สำหรับหนูกลุ่มที่ 5 ทำการทดลองเหมือนกับกลุ่มที่ 4 แต่จะฉีดมอร์ฟีน 33 มก./กก.น้ำหนักตัว ต่อไปจนครบ 5 วัน ในวันที่ 17 จึงหาค่า AD_{50} ได้ 100 มก./กก.น้ำหนักตัว โดยวิธีการเพิ่มขนาดของมอร์ฟีนด้วยค่า AD_{50} ในระหว่างการฉีดสามารถทำให้หนูทดลองพัฒนาการต้อยามอร์ฟีนที่ความเข้มข้นมอร์ฟีนขนาดสูงๆได้ นอกจากนี้การหาค่า AD_{50} ที่ทุกๆช่วงเวลาของการฉีดมอร์ฟีนสามารถจะบอกถึงองศาของการต้อยาได้ ในรูปเดียวกันนี้แสดงถึงผลของการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ หลายๆครั้งเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลองต่อค่า AD_{50} พบว่าเมื่อฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เข้าไปในหนูทดลองนานจนครบ 3, 7, 11 และ 16 วัน ค่า AD_{50} เท่ากับ 4, 5, 6 และ 6 มก./กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับ ซึ่งค่า AD_{50} เหล่านี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากค่า AD_{50} ของหนูกลุ่มที่ไม่เคยได้รับการฉีดมอร์ฟีนมาก่อนเลย

เมื่อนำค่า morphine AD_{50} กับวันที่ของการฉีดมอร์ฟีนมาเขียนบนกระดาษกราฟ semilog จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (รูปที่ 12) แสดงว่าการให้มอร์ฟีนตามกำหนดเวลาดังกล่าวแล้วจะให้ความสัมพันธ์ระหว่างการต้อยากับการเปลี่ยนแปลงของการกระตุ้น (reenforcement schedule) มีลักษณะเป็นเอกซ์โพเนนเชียล ฟังค์ชั่น (exponential function) ซึ่งมีอัตราการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่ในช่วงการเปลี่ยนแปลงที่ศึกษา

8. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ binding protein

Binding protein ที่เตรียมได้จากต่อมหมวกไตของวัวตามวิธีข้อ 7.3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจะสูญเสีย activity น้อยมากภายในเวลา 7 เดือน ทุกครั้งก่อนนำมาใช้จะปั่นเอาตะกอนของโปรตีนที่เกิดขึ้นออกเสียก่อน แล้วนำส่วนใสมาเจือจางความเข้มข้นของโปรตีนด้วย 0.01 M Tris-HCl buffer pH 7.4 ซึ่งมี 0.006 M mercaptoethanol

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณมอร์ฟีนในบริเวณส่วนต่างๆของสมองหนูทดลองที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว

ส่วนของสมอง	ปริมาณมอร์ฟีนในสมอง *(ng/g สมอง)				MEAN±S.D.
	หนูกลุ่มควบคุม	หนูกลุ่มทดลอง			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
Cortex	0	64.50	82.60	73.80	73.63 ± 9.05
Thalamus & Hypothalamus	0	122.00	112.00	76.40	103.47 ± 23.97
Midbrain	0	91.39	86.15	64.50	80.68 ± 14.26
Cerebellum	0	122.25	106.00	83.00	103.75 ± 19.72
Pons & Medulla	0	109.48	102.90	87.45	99.94 ± 11.31

* ปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้ในแต่ละส่วนของสมองเป็นผลจากค่าผลรวมของหนู 4 ตัว หลังจากฉีดมอร์ฟีน นาน 40 นาที

รูปที่ 11 แสดงถึงผลของการพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนในหนูทดลอง

ใช้หนูทั้งหมด 150 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม สำหรับหนูกลุ่ม 2, 3, 4 และ 5 ฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนัง วันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1 = หนูที่ไม่เคยได้รับมอร์ฟีนมาก่อน

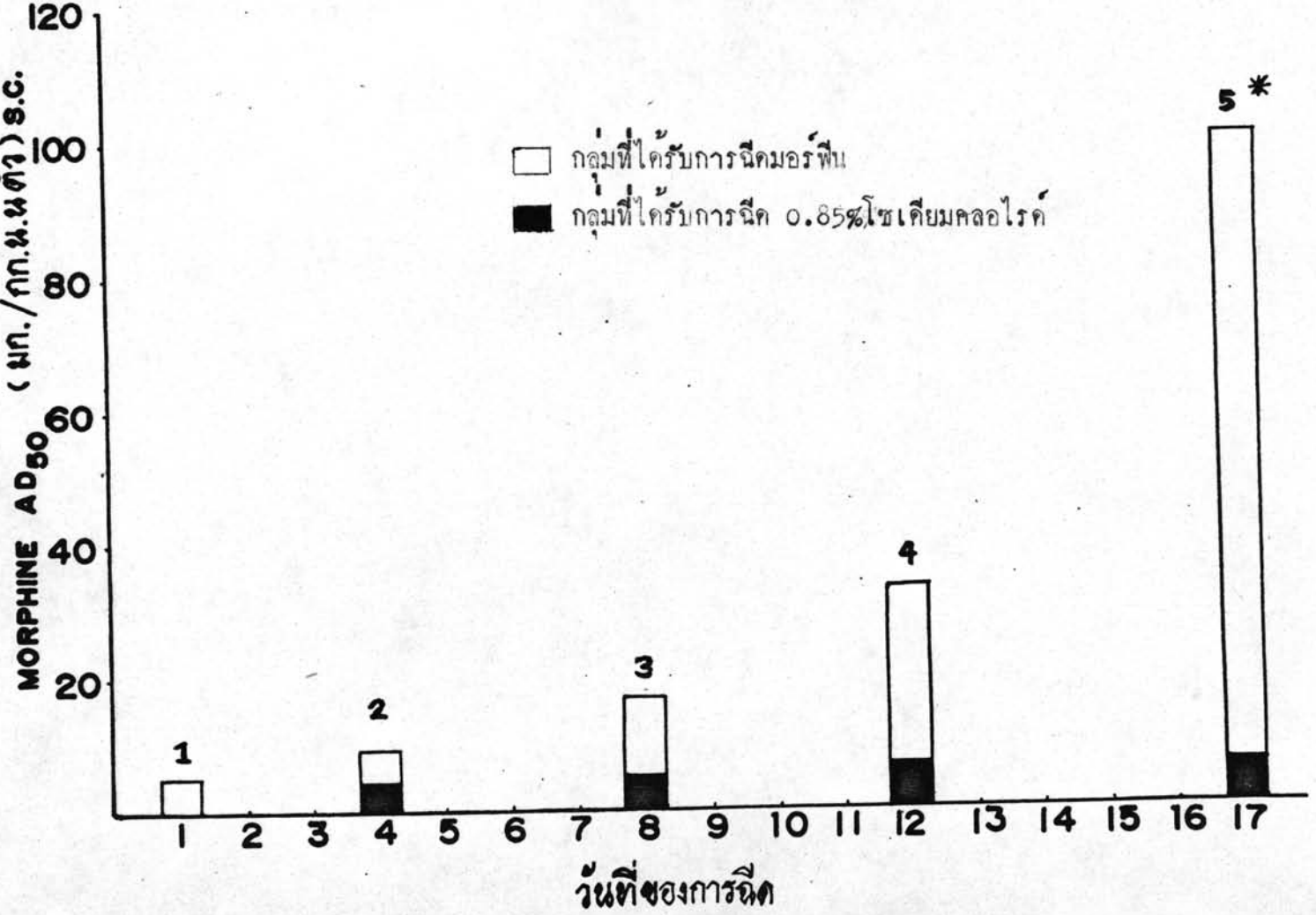
กลุ่มที่ 2 = หนูถูกฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว ครบ 3 วัน

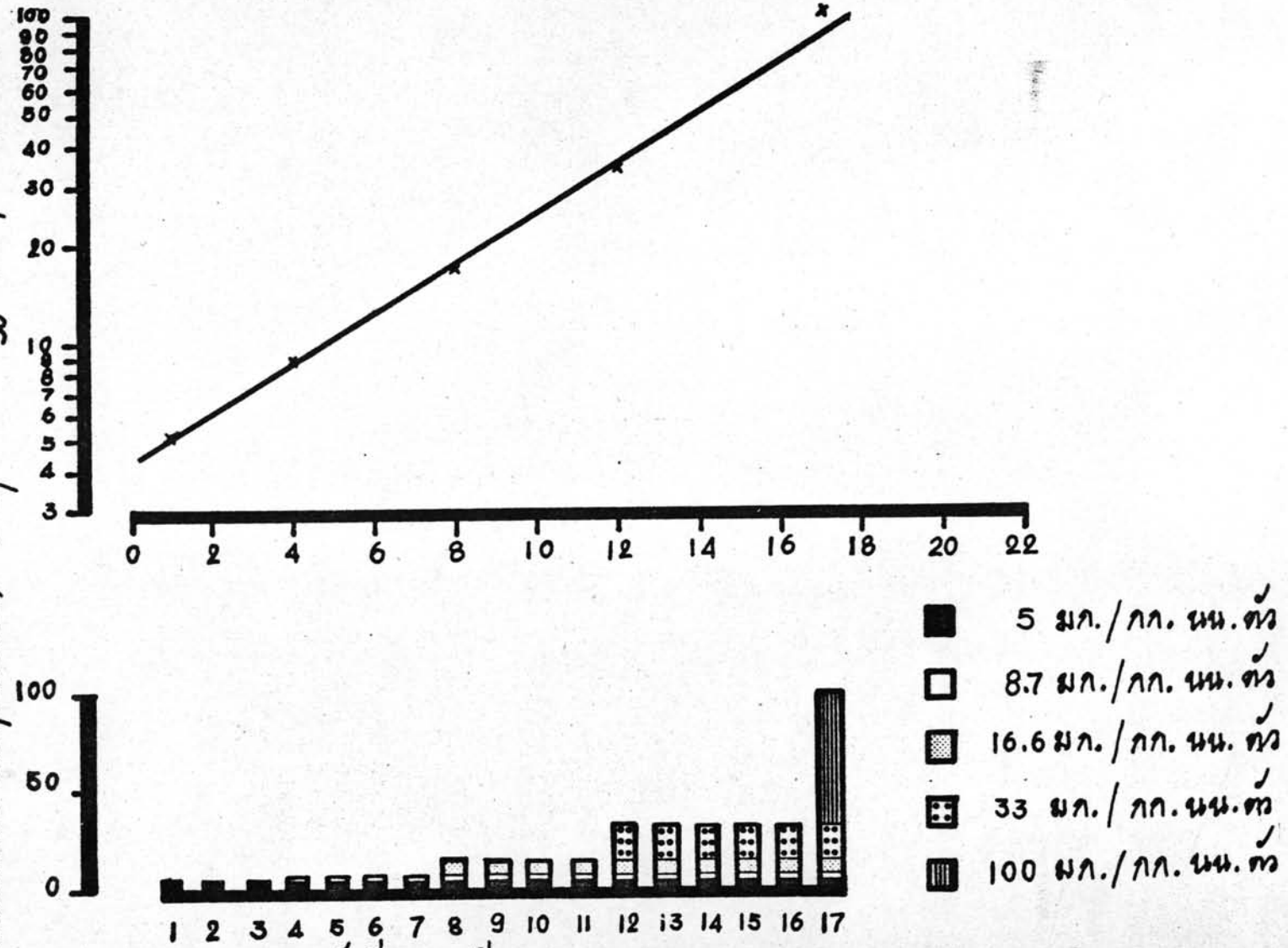
กลุ่มที่ 3 = หนูถูกฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว 3 วัน ในวันที่ 4 เพิ่มปริมาณของมอร์ฟีนเป็น 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน

กลุ่มที่ 4 = หนูถูกฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว 3 วัน ในวันที่ 4 เพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 8 เพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน

กลุ่มที่ 5 = หนูถูกฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว 3 วัน ในวันที่ 4 เพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 8 เพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 12 เพิ่มปริมาณมอร์ฟีนเป็น 33 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 5 วัน

* เป็นค่า $^{AD}_{50}$ ที่ได้จากการใช้หนูทั้งหมด 22 ตัว เนื่องจากหนูทดลองตาย 8 ตัว หลังจากให้มอร์ฟีน 33 มก./กก.น้ำหนักตัว นาน 12 ชั่วโมง


MORPHINE AD50 (มก./กก.น.น.ตัว) s.c.
120
100
80
60
40
20
กลุ่มที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีน
กลุ่มที่ได้รับการฉีด 0.85%โซเดียมคลอไรด์
1
2
3
4
5 *
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
วันที่ของการฉีด



รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า morphine AD_{50} กับวันที่ของการฉีดบนกระดาษกราฟ semi-log

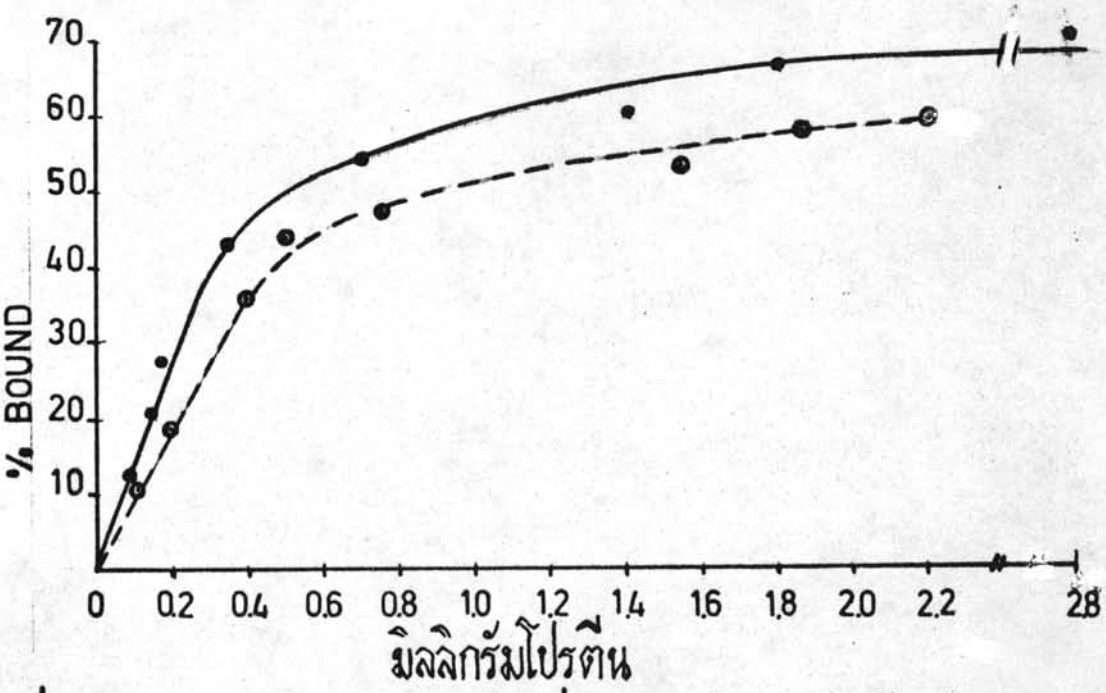
ตารางแสดงถึงปริมาณมอร์ฟีนที่ฉีดเข้าไปในหนูทดลอง

จากผลการทดลองในรูปที่ 13 เมื่อเจือจาง binding protein ที่เตรียมได้จากการปั่น 105,000 xg กับ 27,000xg (binding protein ทั้ง 2 ชนิดนี้มีขั้นตอนในการเตรียมทุกอย่างที่เหมือนกัน ยกเว้นขั้นตอนในการปั่น) ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆกันด้วย buffer จึงนำมาทำปฏิกิริยากับ H^3-cyclic AMP 0.96 พิโคโมล แล้วดำเนินต่อตามวิธี 7.8 จะเห็นลักษณะของกราฟทั้ง 2 เส้นคล้ายกัน นั่นคือมีจุดอิ่มตัวเกิดขึ้นที่ความเข้มข้นของโปรตีนสูงๆ แต่ค่า % bound ที่ได้จากการปั่น 105,000 xg สูงกว่า 27,000 xg เมื่อให้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากัน ดังนั้นในการทดลองหาปริมาณ cyclic AMP สำหรับงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ binding protein ที่ได้จากการปั่น 105,000 xg และความเข้มข้นโปรตีนของ binding protein ที่เหมาะสมในการวัดปริมาณทุกครั้งจะอยู่ในช่วงซึ่งค่า % bound เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของโปรตีน จากกราฟจะเห็นว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้อยู่ในช่วงไม่เกิน 0.4 มิลลิกรัม

$$\% \text{ bound} = \frac{\text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีในส่วนใสเมื่อใส่ binding protein} - \text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีในส่วนใสเมื่อไม่ใส่ binding protein}}{\text{จำนวนรังสีทั้งหมดที่ใส่ลงไป}}$$

9. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H^3-cyclic AMP

เมื่อทดลองใช้ H^3-cyclic AMP ที่ความเข้มข้นต่างๆกันมาทำปฏิกิริยากับ binding protein ปริมาณคงที่ (0.22 มิลลิกรัม) แล้วดำเนินต่อตามวิธี 7.8 ผลจากการทดลองในรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ H^3-cyclic AMP ขึ้นไปเรื่อยๆ จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่การเพิ่มของมันจะไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นเมื่อความเข้มข้นของ H^3-cyclic AMP มากกว่า 0.96 พิโคโมล ในการทดลองวัดปริมาณ cyclic AMP จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ H^3-cyclic AMP 0.96 พิโคโมล



รูปที่ 13 ปริมาณ binding protein ที่เหมาะสมในการจับกับ [^{3}H]-cyclic AMP ที่ใช้หา ปริมาณ cyclic AMP

เจือจาง binding protein ด้วย 0.01 M Tris-Hcl buffer pH7.4 ซึ่งมี 0.006 M mercaptoethanol ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆกัน เตรียม incubation mixture ปริมาตรทั้งหมด 250 – ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris-Hcl buffer pH 7.4, 1.6 mM theophylline, 1.2 mM mercaptoethanol, [^{3}H]-cyclic AMP 0.96 พีโคโมล และ binding protein ที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆกัน incubate นาน 90 นาที ในถาดน้ำแข็ง

●——● binding protein ที่ได้จากการปั่น 105,000 xg 1 ชม.

⊙------⊙ binding protein ที่ได้จากการปั่น 27,000xg 1 ชม.

หมายเหตุ binding protein ทั้ง 2 ชนิดนี้มีขั้นตอนการเตรียมทุกอย่างที่เหมือนกัน ยกเว้นขั้นตอนในการปั่น

$$cpm = \begin{array}{l}\text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีในส่วนใสเมื่อใส่ binding protein -} \\ \text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีในส่วนใสเมื่อไม่ใส่ binding protein}\end{array}$$

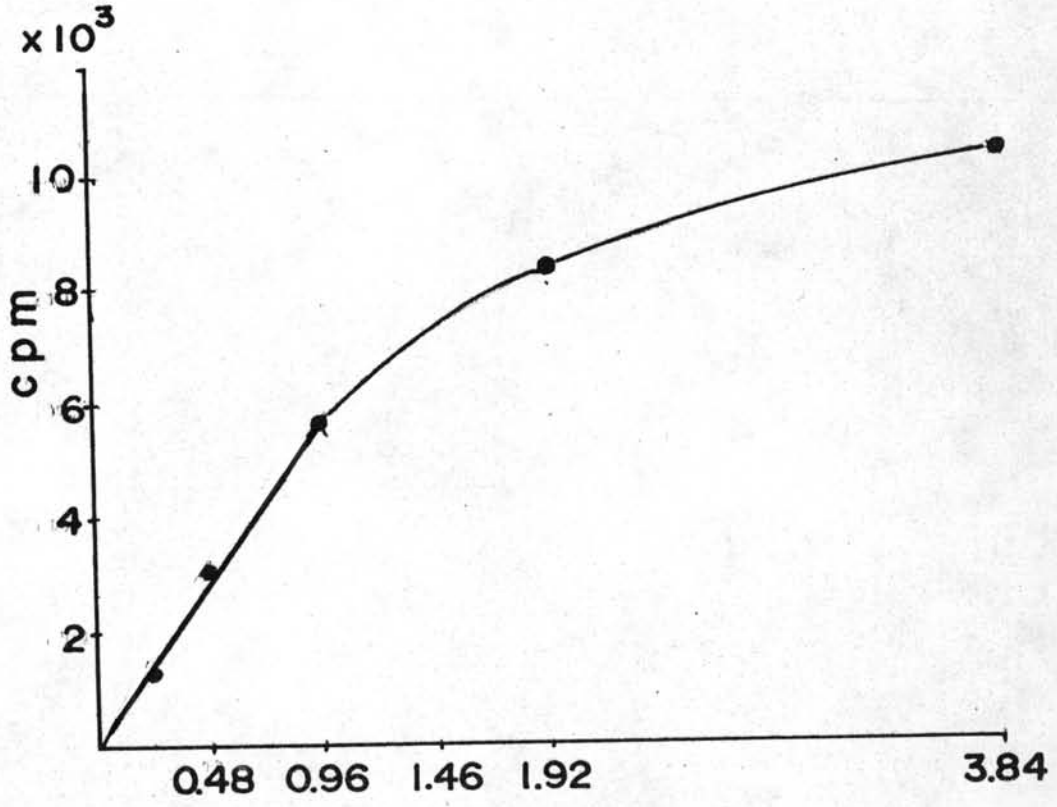
10. การสร้างกราฟมาตรฐานของ cyclic AMP

เมื่อใช้สารละลายมาตรฐานของ cyclic AMP ที่ความเข้มข้นต่างๆกันไปแย่งที่ H^3-cyclic AMP ซึ่งจับอยู่กับ binding protein แล้วคำนินตามหัวข้อ 7.8 จากผลการทดลองในรูปที่ 15 จะเห็นว่า cyclic AMP สามารถแย่งที่ของ H^3-cyclic AMP ซึ่งจับอยู่กับbinding protein ได้โดยความสามารถในการแย่งที่จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ cyclic AMP และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cyclic AMP ในการแย่งที่ซึ่งจะเป็นรัดส่วนโดยตรงกับค่า Co/Cx จะอยู่ในช่วงระหว่าง 2-16 พิโคโมล เมื่อแสดงความสัมพันธ์บนกระดาษกราฟธรรมดา ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 2 พิโคโมล แล้ว cyclic AMP ไม่สามารถแย่งที่ H^3-cyclic AMP ถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่า 16 พิโคโมล ความสามารถของการแย่งที่จะไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ cyclic AMP จากการทดลองนี้สามารถวัดปริมาณ cyclic AMP ในสารตัวอย่างได้โดยการอ่านจากกราฟมาตรฐาน

$$Co/Cx = \frac{\begin{array}{l}\text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีเมื่อไม่มี cyclic AMP - จำนวนรังสีที่} \\ \text{นับได้ต่อนาทีใน background}\end{array}}{\begin{array}{l}\text{จำนวนรังสีที่นับได้ต่อนาทีเมื่อเติม cyclic AMP - จำนวนรังสีที่} \\ \text{นับได้ต่อนาทีใน backbround}\end{array}}$$

11. ประสิทธิภาพของการสะกัด cyclic AMP

ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาว่าในระหว่างที่สะกัด cyclic AMP ออกจากสมองจะมีการสูญเสียปริมาณ cyclic AMP ไปมากน้อยสักเท่าไร โดยเติม H^3-cyclic AMP (25 mCi/0.96 p mole) กับ cyclic AMP



รูปที่ 14 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ [H^3]- cyclic AMP กับความสามารถของ [H^3] -cyclic AMP ในการจับกับ binding protein

เจือจาง [H^3] -cyclic AMP ด้วย assay buffer ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน เตรียม incubation mixture ปริมาตรทั้งหมด 250 ไมโครลิตร ซึ่งมี [H^3]-cyclic AMP ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน, 10 mM Tris-Hcl buffer pH 7.4, 1.6 mM theophylline, 1.2 mM mercaptoethanol และ binding protein 0.22 มิลลิกรัม incubate นาน 90 นาที ในถาดน้ำแข็ง

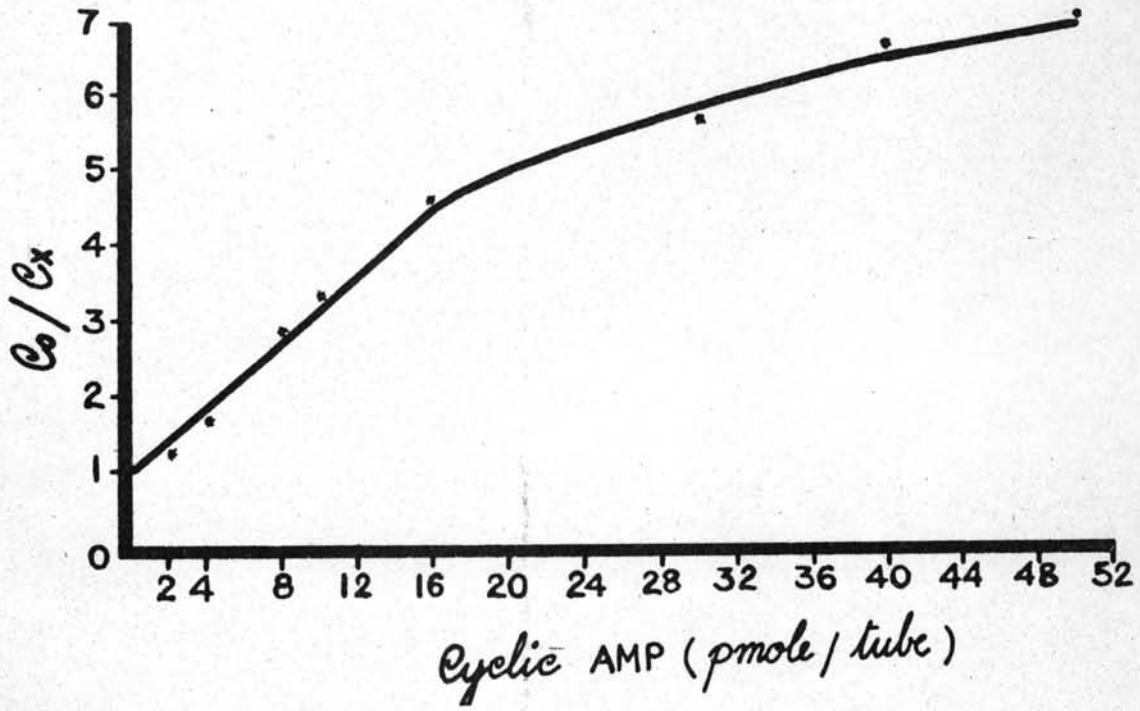
ที่มีปริมาณต่างๆกัน คือ 250, 500 และ 1,000 พิโคโมล ลงไปใน homogenate ของสมองแล้วสะกัด cyclic AMP ตามวิธี 7.2.1 จากผลการทดลองใน ตารางที่ 14 พบว่าได้ค่า % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 87.6, 88.6 และ 89.5 ตามลำดับ

12. การศึกษาระดับ cyclic AMP ในส่วนต่างๆ (5 ส่วน) ของสมองหนูทั้ง 3 สภาวะ คือ สภาวะได้รับยาแบบเรื้อรัง, สภาวะได้รับยาแบบเฉียบพลัน และ สภาวะควบคุม

ตารางที่ 15 แสดงถึงระดับ cyclic AMP ในบริเวณทั้ง 5 ส่วนของ สมอง คือ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain, cerebellum และ pons + medulla จากผลการทดลองพบว่าระดับ cyclic AMP ในบริเวณทั้ง 5 ส่วน ของสมองในหนูที่ได้รับการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ติดต่อกัน เป็นเวลา 3, 7, 11 และ 16 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อให้ระดับความเชื่อมั่น 95% (ทดสอบทางสถิติโดยใช้ analysis of variance)

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ cyclic AMP ในสมองของหนูที่ได้รับ มอร์ฟีนแบบเรื้อรัง โดยมีค่าองศาการดื้อยาต่างๆกัน (ตารางที่ 16) พบว่าระดับ cyclic AMP ในบริเวณ cortex มีแนวโน้มลดลงเมื่อค่า AD_{50} เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อค่า AD_{50} 100 มก./กก.น้ำหนักตัว ทั้งนี้เปรียบเทียบกับหนูที่มีค่า AD_{50} เท่ากับ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว

ถ้าศึกษาระดับ cyclic AMP ในบริเวณ thalamus + hypothalamus พบว่าเมื่อค่า AD_{50} เท่ากับ 16.6, 33 และ 100 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีค่า AD_{50} เท่ากับ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว



รูปที่ 15 แสดงกราฟมาตรฐานของ cyclic AMP

เตรียม stock cyclic AMP 0.005 มิลลิโมล/มิลลิลิตร เจือจาง cyclic AMP จาก stock ด้วย 0.05 M Tris-Hcl buffer pH 7.4 (0.008 M theophylline กับ 0.006 M mercaptoethanol) ให้ได้ความเข้มข้น 0.5-50 พิโคโมล เตรียม incubation mixture ปริมาตรทั้งหมด 250 ไมโครลิตร ซึ่งมี 10 mM Tris-Hcl buffer pH 7.4, 1.6 mM theophylline, 1.2 mM mercaptoethanol, cyclic AMP ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน, [^{3}H] - cyclic AMP 0.96 พิโคโมล และ binding protein 0.22 มิลลิกรัม incubate นาน 90 นาที ในถาดน้ำแข็ง

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของวิธีการสะกัด cyclic AMP ออกจากโฮโมจีเนตร์ของสมอง

หลอดทดลอง	ปริมาณเนื้อสารของ H^3cAMP + cAMP (p mole)	% recovery*	C.V. (%)**
1	250	87.6 ± 6.0	6.8
2	500	88.6 ± 3.0	3.5
3	1,000	89.5 ± 2.5	2.5

* แสดงค่า MEAN ± S.D. จากการทดลอง 3 ครั้ง

** สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation)

สำหรับบริเวณ midbrain ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP เมื่อค่า AD_{50} เท่ากับ 8.7 และ 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว แต่หลังจากหนูติดยาที่ค่า AD_{50} มากกว่า 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP จะเริ่มลดลง และการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า AD_{50} 100 มก./กก. น้ำหนักตัว ทั้งนี้เปรียบเทียบกับหนูที่มีค่า AD_{50} เท่ากับ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว

ระดับ cyclic AMP ในบริเวณ cerebellum พบว่าจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อค่า AD_{50} เท่ากับ 16.6, 33 และ 100 มก./กก.น้ำหนักตัว เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีค่า AD_{50} เท่ากับ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว

ในบริเวณ pons + medulla พบว่าระดับ cyclic AMP ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า AD_{50} เพิ่มขึ้นจาก 8.7 จนถึง 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

เมื่อเปรียบเทียบระดับ cyclic AMP ในบริเวณทั้ง 5 ส่วนของสมองในหนูที่พัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนกับหนูที่ได้รับมอร์ฟีนแบบเฉียบพลันที่ปริมาณมอร์ฟีน 5, 8.7, 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว จากผลการทดลองในรูปที่ 16ก, ข, ค, ง และ จ จะเห็นว่าระดับ cyclic AMP ในบริเวณ cortex, thalamus + hypothalamus midbrain และ cerebellum ของหนูที่ได้รับยาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณมอร์ฟีนต่างๆจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูติดยาที่ปริมาณมอร์ฟีนเดียวกัน ยกเว้นในบริเวณ cerebellum เฉพาะเมื่อหนูได้รับยาแบบเฉียบพลัน 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP สูงกว่าหนูติดยา 8.7 มก./กก. น้ำหนักตัว สำหรับบริเวณ pons + medulla (รูปที่ 16ง) พบว่าการได้รับแบบเฉียบพลัน 5, 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP จะสูงกว่าในหนูติดยา 5 และ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว แต่ถ้าหนูติดยามากกว่า 8.7 มก./กก. น้ำหนักตัว การได้รับยาแบบเฉียบพลัน 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP จะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ติดยา 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว

ตารางที่ 15 ระดับ cyclic AMP ในส่วนต่างๆของสมองหนูที่ได้รับการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ติดต่อกันเป็นเวลา 3, 7, 11 และ 16 วัน

ส่วนของสมอง	ระดับ cyclic AMP (n mole/g wet weight*			
	จำนวนวันที่ฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์			
	3	7	11	16
Cortex	3.50± 0.76	3.09 ±0.84	3.78 ±0.53	3.74 ±0.65
Thalamus & Hypothalamus	4.75 ±0.57	4.06± 0.99	4.69 ±0.51	4.71 ±0.85
Midbrain	2.48± 0.50	2.99 ±1.26	3.20± 1.28	2.84 ±0.79
Cerebellum	12.50 ±3.64	9.98 ±1.35	11.40 ±0.29	10.37 ±1.55
Pons & Medulla	2.53 ±0.92	2.95± 0.52	3.19± 0.89	3.12 ±0.82

* แสดงค่า MEAN± S.D. จากการใช้หนูทดลอง 3 ตัว

ตารางที่ 16 ระดับ cyclic AMP ในส่วนต่างๆของสมองในหนูที่ได้รับมอร์ฟีน แบบเรื้อรัง เมื่อให้ค่าองศาการดื้อยาต่างๆกัน

ส่วนของสมอง	ระดับ cyclic AMP (n mole/g wet weight*			
	องศาการดื้อยา (AD_{50}) มก./กก.น้ำหนักตัว			
	8.7	16.6	33	100
Cortex	3.80 ± 0.78	3.37 ± 0.51	2.79 ± 0.63	1.94 ± 0.33**
Thalamus & Hypothalamus	4.31 ± 0.85	2.76 ± 0.33**	2.98 ± 0.58**	2.04 ± 0.76**
Midbrain	3.94 ± 1.02	3.90 ± 1.74	3.26 ± 0.59	2.45 ± 0.35**
Cerebellum	10.59 ± 2.83	5.79 ± 2.00**	5.84 ± 1.64**	6.21 ± 2.10**
Pons & Medulla	1.97 ± 0.44	1.88 ± 0.65	2.50 ± 0.32	2.01 ± 0.34

* แสดงค่า MEAN ± S.D. จากการใช้หนูทดลอง 4 ตัว

** แตกต่างจากกลุ่มที่มีค่า AD_{50} = 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว เมื่อให้ระดับความเชื่อมั่น 95%

รูปที่ 16 เปรียบเทียบระดับ cyclic AMP ในบริเวณ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain, cerebellum และ pons + medulla ในหนูที่ติดมาการดื้อยากับหนูที่ได้รับยาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณมอร์ฟีน 5, 8.7, 16.6 และ 33 มก./กก. น้ำหนักตัว

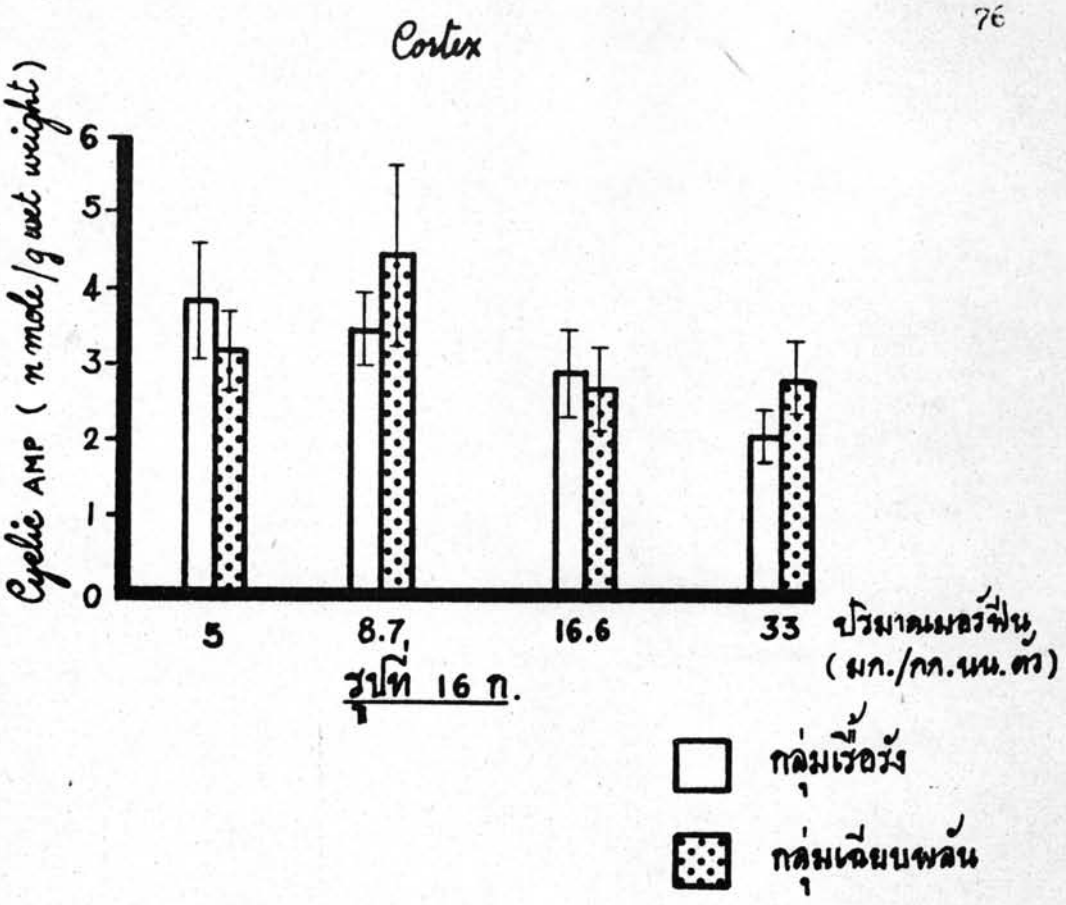
ก. cortex

ข. thalamus + hypothalamus

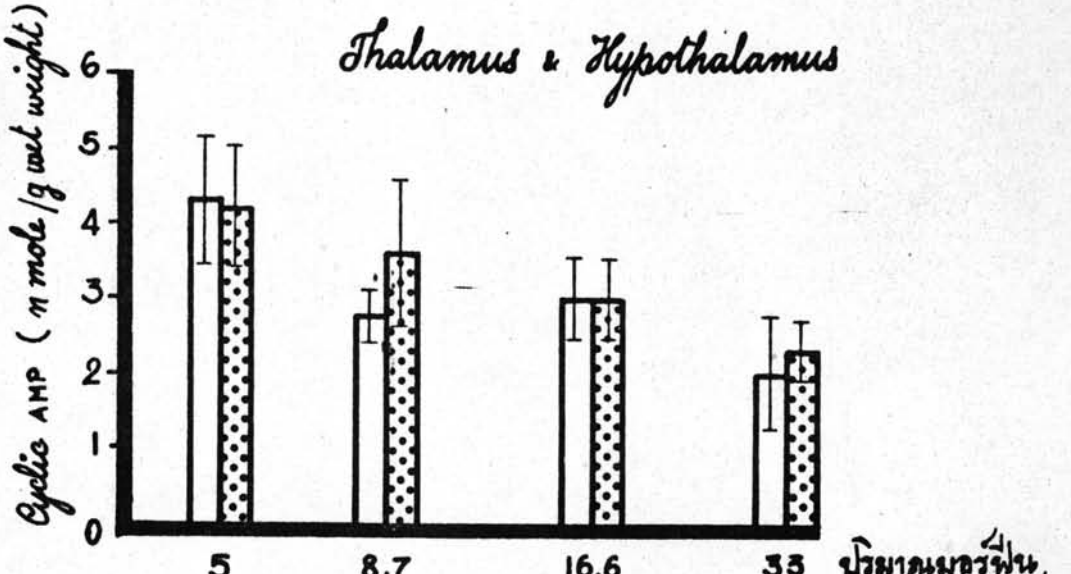
ค. midbrain

ง. pons + medulla

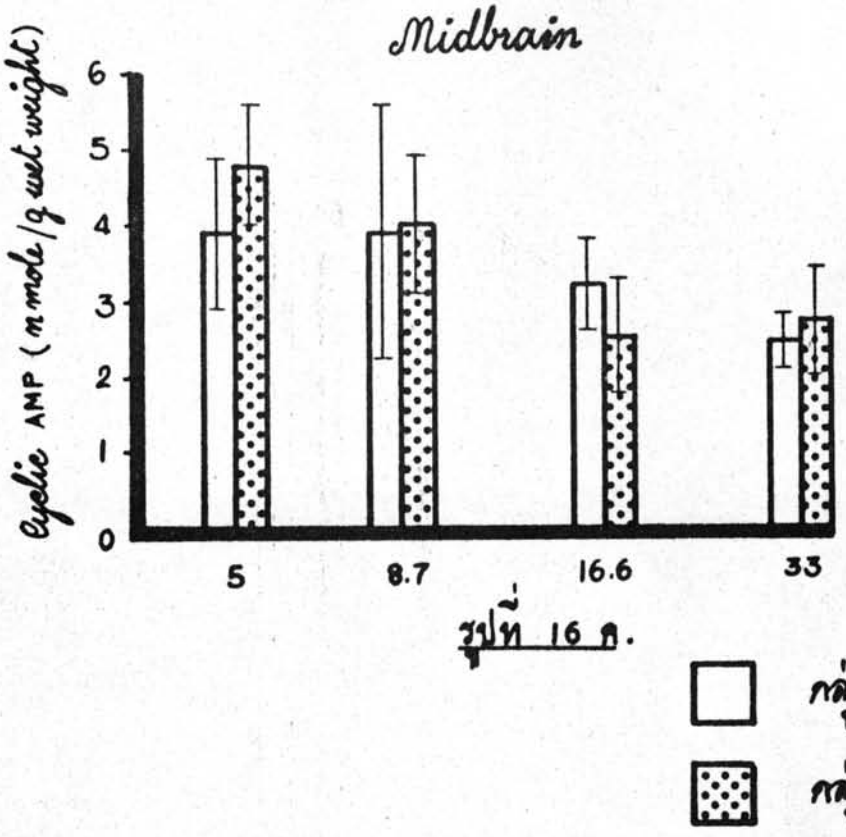
จ. cerebellum



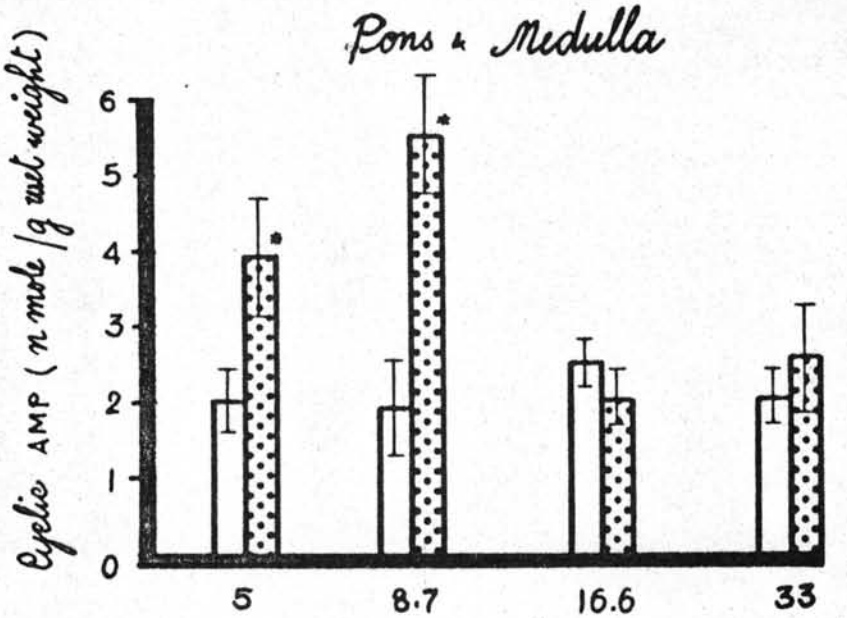
รูปที่ 16 ก.



รูปที่ 16 ข.

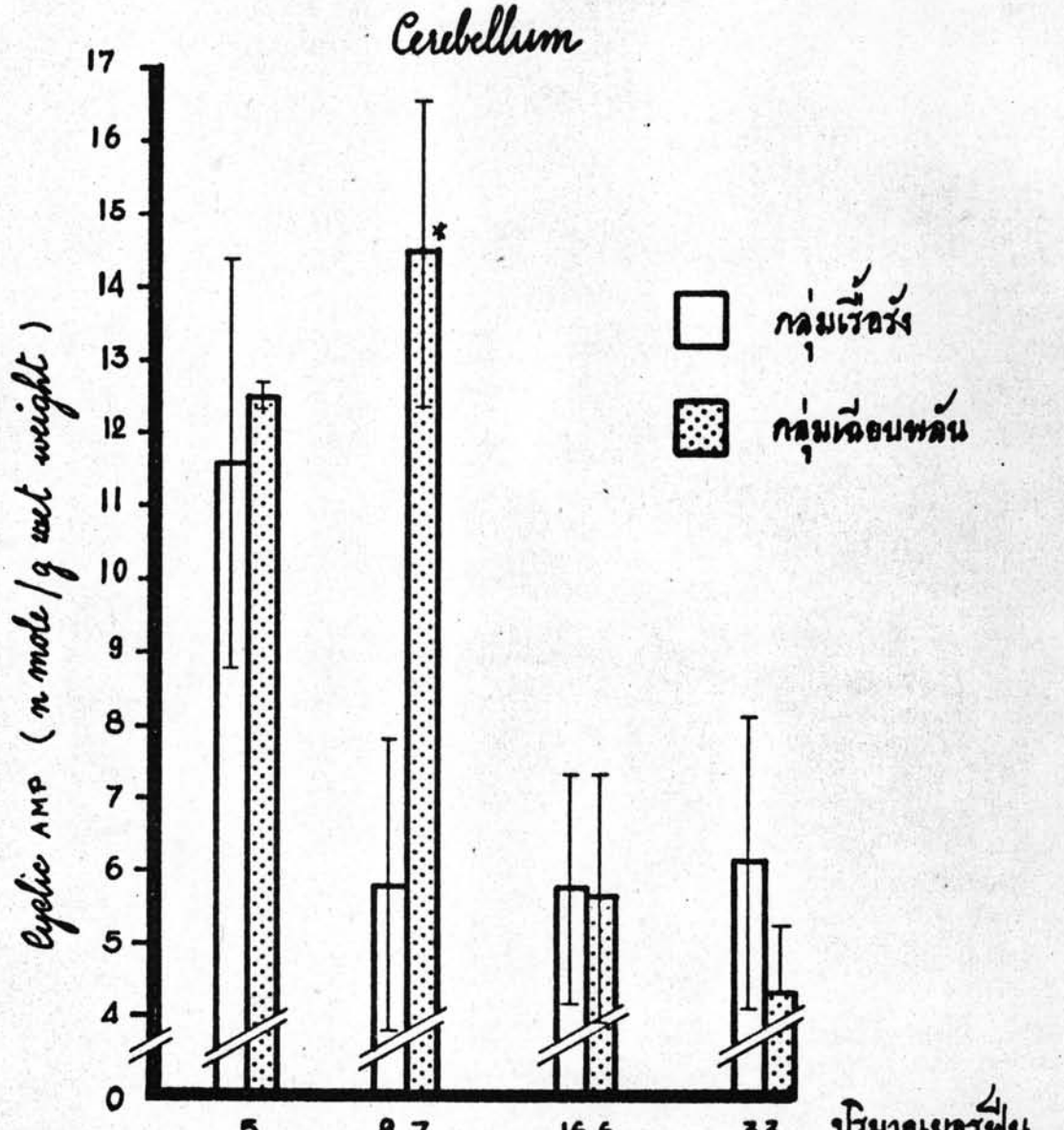


รูปที่ 16 ก.



รูปที่ 16 ข.

* กลุ่มเฉียบพลันแตกต่างจากกลุ่มเรื้อรัง เมื่อให้ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 16 ง.

* กลุ่มเฉียบพลันแตกต่างจากกลุ่มเรื้อรัง เมื่อให้ระดับความเชื่อมั่น 95%