การพัฒนาวิธีวัดความต้องยาม่อร์ฟีนและความสัมพันธ์ขององค์ประกอบของการต้องยากับระดับอะดีโนซีน 3', 5' โมโนฟอสเฟตในสมองหนูส่วนต่างๆ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวเสาวณีย์ กาญจนชุมพล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2522

006236

i 18126212

Development of the Method for Determination of Morphine Tolerance and the Correlation of Degree of Tolerance to the Level of Adenosine 3', 5' Monophosphate in the Various Portions of Rat Brain

Miss Sauwanee Karnjanachumpon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University

1979

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีวัดความดื้อยามอร์ฟีนและความสัมพันธ์ขององศา ของการดื้อยากับระดับอะดีโนซีน 3', 5' โมโนฟอสเฟตใน สมองหนูส่วนต่างๆ
โดย	นางสาวเสาวณีย์ กาญจนชุมพล
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดี บัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ไขศรี อาภรณ์รัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วิชัย โปษยะจินดา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์จิตร สิทธิอมร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีวัดความดื้อยามอร์ฟีนและความสัมพันธ์ขององศา ของการดื้อยากับระดับอะดีโนซีน 3', 5' โมโนฟอสเฟตใน สมองหนูส่วนต่างๆ

ชื่อนิสิต นางสาวเสาวณีย์ กาญจนชุมพล

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

ภาควิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2522

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้สร้างวิธีการพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนในหนู โดยการฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนังและใช้ค่า median "analgetic" dose (AD_{50}) คือปริมาณมอร์ฟีนที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง แล้วทำให้ 50 เปอร์เซนต์ปลายหางของหนูทดลองไม่เกิดกระดิกเมื่อถูกจุ่มอยู่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 10 วินาที เป็นดัชนีบ่งระดับการเพิ่มปริมาณมอร์ฟีนที่ใช้ฉีดเพื่อพัฒนาความดื้อยา ในการทดลองได้ใช้ค่า AD_{50} เป็นตัววัดองศาของการดื้อยา ซึ่งพบว่าระดับองศาการดื้อยาจะเพิ่มขึ้นจาก 5 เป็น 8.7, 16.6, 33 และ 100 มก./กก. น้ำหนักตัว ตามลำดับ

ในกลุ่มหนูที่ดื้อยาด้วยค่า AD_{50} สูงกว่า 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว จะพบการลดลงของระดับ cyclic AMP ในบริเวณสมองส่วน cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain และ cerebellum ในขณะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP ในส่วนของ pons + medulla และการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP ในสมองส่วนต่างๆที่องศาของความดื้อยาต่างๆกันนี้จะสอดคล้องกับค่าการเปลี่ยนแปลงที่พบในกลุ่มหนูที่ได้รับยาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณมอร์ฟีนเท่ากัน ยกเว้นบริเวณสมองส่วน pons + medulla เท่านั้นที่ระดับ cyclic AMP จะเพิ่มเมื่อฉีดมอร์ฟีนแบบเฉียบพลันด้วยขนาด 5 และ 8.7 มก./กก. น้ำหนักตัว

Thesis Title Development of the Method for Determination of Morphine Tolerance and the Correlation of Degree of Tolerance to the Level of Adenosine 3', 5' Monophosphate in the Various Portions of Rat Brain

Name Miss Sauwanee Karnjanachumpon

Thesis Advisor Assistant Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Department Biochemistry

Academic Year I979

ABSTRACT

The present study is an attempt to produce tolerance to morphine in the rat by injecting the drug subcutaneously and using median "analgetic" dose (AD_{50}) as an index indicating the amount of that morphine which will create tolerance. AD_{50} is the dose of morphine which will stop 50 percent of the rat tail to wiggle when immersed in water, 58°C for I0 second. In this study the degree of tolerance as measured by AD_{50} increased from 5 to 8.7, I6.6, 33 and I00 mg per kg body weight respectively.

In the rats with AD_{50} greater than 8.7 mg per kg body weight the levels of cyclic AMP were decreased in the cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain and cerebellum while that in the pons + medulla remained unchanged.

The change in the level of cyclic AMP in various parts of the brain in different degrees of morphine tolerance correspond to that found in rats given the same amount of morphine acutely. Only in the pons + medulla there was an increase in the level of cyclic AMP when the acute morphine dose 5 and 8.7 mg per kg body weight were injected.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ และขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์จิตร สิทธิอมร
ศาสตราจารย์ ไขศรี อาภรณ์รัตน์
รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วิชัย โปษยะจินดา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์
แพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง
คุณประณิต ประวัติเมือง
คุณไพพรรณ พิทยานนท์
คุณวิไล ชินเวชกิจวานิชย์
คุณอุษณีย์ พึ่งปาน
คุณจำรัส ทรัพย์สมานวงศ์

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ตึกนวมินทราชินี โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
ภาควิชาโลหิตวิทยา ตึกอนันทราช คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย
เจ้าหน้าที่ของโรงงานฆ่าสัตว์ บริษัทสหสามัคคีค้าสัตว์ กล้วยน้ำไท ที่ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่ง ในการเก็บต่อมหมวกไตของวัว
ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ทุนมหินทราธิเบศร์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ต

รายการตารางประกอบ ..... ง

รายการรูปประกอบ ..... ฉ

คำย่อ ..... ช

บทที่

1. บทนำ 1
2. วัสดุและเคมีภัณฑ์ 26
3. วิธีการวิจัย .....
   1. การเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง 30
   2. การให้มอร์ฟีน และ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 30
   3. วิธีทดสอบการระงับปวด (analgesic response) ในหนูทดลองหลังจากฉีดมอร์ฟีน หรือ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 31
   4. การหาค่า median "analgetic" dose (AD_{50}). 33
   5. การทำให้หนูทดลองพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีน 33
   6. การหาปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มและสมองของหนูทดลอง 36
   7. การศึกษาปริมาณ cyclic AMP ในสมอง 38
4. ผลการวิจัย
   1. ผลของการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์และมอร์ฟีนต่อการ response ของหางหนู 46

หน้า

2. ผลของการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์และมอร์ฟีนทุกๆ วันต่อการ response ของหางหนู เมื่อกระตุ้นด้วยความร้อน 48
3. ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีนต่อการเกิด analgesic response 51
4. ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีนต่อการเกิด analgesic response ในหนูทดลองที่ดื้อยา 51
5. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมองหนูกับการเกิด analgesic response 55
6. การกระจายของมอร์ฟีนในส่วนต่างๆของสมองหนูที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีน 58
7. การทำให้หนูทดลองพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีน 58
8. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ binding protein..... 62
9. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H^3-cyclic AMP. 66
10. การสร้างกราฟมาตรฐานของ cyclic AMP 68
11. ประสิทธิภาพของการสะกัด cyclic AMP..... 68
12. การศึกษาระดับ cyclic AMP ในส่วนต่างๆ (5 ส่วน) ของสมองหนู 3 สภาวะ คือ สภาวะได้รับยาแบบเรื้อรัง, สภาวะได้รับยาแบบเฉียบพลัน และสภาวะควบคุม 70

5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 79

เอกสารอ้างอิง 96

ประวัติผู้เขียน 109

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณ receptor ของฝิ่นในบริเวณส่วนต่างๆของสมองลิง (Macaca mulatta) 8

ตารางที่ 2 แสดงถึงองค์ประกอบต่างๆที่ใช้ในการหาค่า AD_{50} 34

ตารางที่ 3 แสดงถึงส่วนประกอบของสารต่างๆและปริมาตรของสารที่ใช้ในการวัดปริมาณมอร์ฟีน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์.... 37

ตารางที่ 4 การ response ของหางหนูในช่วงเวลาต่างๆกันหลังจากฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เข้าใต้ผิวหนังจำนวน 0.5 มล. 47

ตารางที่ 5 การ response ของหางหนูในช่วงเวลาต่างๆหลังจากฉีดมอร์ฟีน จำนวน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนังจำนวน 0.5 มล. 49

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการ response ของหางหนูก่อนฉีดและหลังฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ในวันและช่วงเวลาต่างกัน 50

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบผลการฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ต่อการเกิด analgesic response ในวันและช่วงเวลาต่างๆกัน 52

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลของการฉีดมอร์ฟีน 8 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ต่อการเกิด analgesic response ในวันและช่วงเวลาต่างๆกัน 53

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบผลการฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน ต่อการเกิด analgesic response ในวันและช่วงเวลาต่างๆกัน 54

หน้า

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีน ต่อการเกิด analgesic response 56

ตารางที่ 11 ผลของความเข้มข้นมอร์ฟีน ต่อการเกิด analgesic response ในหนูทดลองที่ดื้อยามอร์ฟีน 57

ตารางที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมองของหนูทดลองกับการเกิด analgesic response 60

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณมอร์ฟีนในบริเวณส่วนต่างๆของสมองหนูทดลองที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว .. 63

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของวิธีการสะกัด cyclic AMP ออกจากโซโมจีเนตร์ของสมอง 72

ตารางที่ 15 ระดับ cyclic AMP ในส่วนต่างๆของสมองหนูที่ได้รับการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ติดต่อกันเป็นเวลา 3, 7, 11 และ 16 วัน 74

ตารางที่ 16 ระดับ cyclic AMP ในส่วนต่างๆของสมองในหนูที่ได้รับมอร์ฟีนแบบเรื้อรังเมื่อให้ด่างองศาการดื้อยาต่างๆกัน 75

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	สูตรโครงสร้างของมอร์ฟีน	1
รูปที่ 2	แผนภาพสมองของหนู rat	6
รูปที่ 3	Subcellular localization receptor ของฝิ่น ในสมองหนู rat	11
รูปที่ 4	การสร้างและการทำลาย cyclic AMP	18
รูปที่ 5	หน้าที่ของ cyclic AMP ในสมอง	20
รูปที่ 6	ภาพแสดงถึงวิธีทดสอบการระงับปวดในหนูทดลอง	32
รูปที่ 7	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probits กับ log ความเข้มข้นของมอร์ฟีน	35
รูปที่ 8	ภาพถ่ายสมองหนูแสดงส่วนต่างๆของสมองซึ่งใช้วัดระดับ cyclic AMP	39
รูปที่ 9	แสดงถึงรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูก่อนพัฒนาการดื้อยากับหลังพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีน	59
รูปที่ 10	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมองของหนูทดลองกับการเกิด analgesic response.	61
รูปที่ 11	แสดงถึงผลการพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนในหนูทดลอง	64
รูปที่ 12	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า morphine AD_{50} กับวันที่ของการฉีดบนกระดาษกราฟ semilog	65
รูปที่ 13	ปริมาณ binding protein ที่เหมาะสมในการจับกับ H^3-cyclic AMP ที่ใช้หาปริมาณ cyclic AMP.	67

หน้า

รูปที่ 14 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น H^3-cyclic AMP กับความสามารถของ H^3-cyclic AMP ในการจับกับ binding protein 69

รูปที่ 15 แสดงกราฟมาตรฐานของ cyclic AMP 71

รูปที่ 16 เปรียบเทียบระดับ cyclic AMP ในบริเวณ cortex, thalamus & hypothalamus, midbrain, cerebellum และ pons & medulla ในหนูที่พัฒนาการล้อยากับหนูที่ได้รับยาแบบเฉียบพลัน ที่ปริมาณมอร์ฟีน 5, 8.7, 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว 76

รูปที่ 17 Model การดื้อยามอร์ฟีน 94

คำย่อ

มก./กก.น้ำหนักตัว	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว
มล.	มิลลิลิตร
N	normal
M	molar
µl	microliter
ng/ml	nanogram per milliliter
pmole	picomole
mM	millimolar
nmole/ g wet weight	nanomole per gram wet weight
cAMP	adenosine 3', 5' monophosphate
ATP	adenosine triphosphate
AMP	adenosine monophosphate
ADP	adenosine diphosphate
cyclic IMP	cyclic inosine monophosphate
cyclic GMP	cyclic guanosine monophosphate