บทที่ 5

วิจารณ์และสรุป

การศึกษากลไกของการดื้อยามอร์ฟีนในสัตว์ทดลองนั้น จำเป็นที่จะต้องมีวิธีพัฒนาการดื้อยาอย่างมีระบบ ซึ่งควบคุมได้ และสามารถติดตามวัดองศาของการดื้อยาได้อย่างถูกต้องใกล้เคียงกับความเป็นจริง ในอดีต การพัฒนาให้เกิดการดื้อยาทำได้ โดยการฝังเม็ดมอร์ฟีน (pellet implantation) และการฉีดเข้าในสัตว์ทดลองบ่อย ๆ (Murphee, 1962) แต่วิธีการพัฒนาการดื้อยาในสัตว์ทดลองดังกล่าวมีข้อเสียคือ ถ้าใช้ขนาดของมอร์ฟีนสูง ก็จะทำให้สัตว์ทดลองตาย เพราะได้รับมอร์ฟีนเกินขนาด และโดยปกติมอร์ฟีนจะออกฤทธิ์สูงสุด ในช่วงเวลาจำกัด การทดลองในหนูไมซ์ (mice) การฝังเม็ดมอร์ฟีนขนาด 75 มิลลิกรัม จะออกฤทธิ์สูงสุดในวันที่สาม หลังจากนั้น ฤทธิ์ของมอร์ฟีนจะลดลง (Way และคณะ , 1969) เสาวนีย์ กาญจนชุมพล (1979) ได้พัฒนาวิธีวัดองศาการดื้อยา โดยอาศัยคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวด (analgesia) เป็นตัวดัชนี และดัดแปลงวิธีการทดสอบการระงับปวดซึ่งพัฒนาขึ้นโดย D'Amour และ Smith (1941) โดยฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนังและติดตามการระงับปวดโดยสังเกตการกระดิกของหางหนู เมื่อจุ่มลงในน้ำร้อนที่ 58±1 องศาเซลเซียส หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที ใช้ค่าเปอร์เซ็นต์ การระงับปวดสมบูรณ์ (หางหนูจุ่มในน้ำร้อนได้นานตั้งแต่ 10 วินาที ขึ้นไป) เป็นตัวบ่งถึงการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวด สามารถวัดค่าองศาของการดื้อยา ในหนูซึ่งติดยามอร์ฟีนได้เป็นค่า AD_{50} และเมื่อใช้ค่า AD_{50} ของหนูเป็นปริมาณมอร์ฟีนที่ใช้ฉีดเข้าไปเมื่อพัฒนาความดื้อยาในหนูกลุ่มถัดไปเรื่อย ๆ พบว่าสามารถพัฒนาความดื้อยาขึ้นในหนูอย่างมีระบบ โดยเริ่มตั้งแต่หนูซึ่งมีค่า AD_{50} 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะได้หนูซึ่งมีองศาการดื้อยามอร์ฟีน 8.7, 16, 33 และ 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นับว่าวิธีการพัฒนาการดื้อยา และวัดองศาการดื้อยา วิธีนี้มีประโยชน์และทำได้ง่าย โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือยุ่งยากใด ๆ เลย ยิ่งไปกว่านั้น ยังได้แสดงให้เห็นว่า การออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวดสูงสุด ไม่ว่าจะใช้ขนาดความเข้มข้นเท่าไรก็ตาม จะสูงสุดในช่วงเวลา 40-60 นาที และเมื่อวัดระดับมอร์ฟีนในสมองหลังจากฉีดมอร์ฟีนเป็นเวลาห่าง ๆ กัน ก็พบว่าช่วงเวลาที่ให้ระดับมอร์ฟีนสูงสุดในสมองทั้งในหนู (rat) ปกติและดื้อยา จะมีค่าสอดคล้องกับการออกฤทธิ์สูงสุดของการระงับปวด คือ 40-60 นาที เช่นกัน ดังนั้นการศึกษาผลกระทบของมอร์ฟีน และการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีน ตลอดการ

วิจัยนี้ จึงทำที่เวลา 40 นาที หลังจากการฉีดมอร์ฟีน ในการวิจัยเมื่อใช้วิธีวัดความดื้อยาและการพัฒนาองศาการดื้อยาอย่างมีระบบที่สร้างขึ้นใหม่นี้ ผู้วิจัยสามารถพัฒนาความดื้อยามอร์ฟีนในหนู ได้ค่าสูงถึง ค่า AD_{50} มากกว่า 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ของหนูในเวลา 18 วัน ซึ่งยังไม่เคยมีใครรายงานมาก่อนเลยว่าหนูสามารถจะทนต่อระดับของมอร์ฟีนความเข้มข้นดังกล่าวได้ (หนูปกติเมื่อฉีดมอร์ฟีนความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีหนูตาย 10-15%) รูปแบบของการเพิ่มองศาของการดื้อยา ต่อวันที่เริ่มฉีดมอร์ฟีนจะมีลักษณะเป็นแบบลอการิธึม ซึ่งหมายถึงลักษณะการพัฒนาการดื้อยาควรจะเพิ่มขึ้นไปได้อีกเรื่อย ๆ เสาวณีย์ ได้รายงานว่าการพัฒนาความดื้อยาวิธีนี้จะมีขีดจำกัดที่การละลายของมอร์ฟีนใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ได้ต่ำ ในการทดลองนี้จึงได้เพิ่มปริมาตรของสารละลายมอร์ฟีนที่ใช้ฉีดโดยการแบ่งฉีด 2 ครั้ง ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร

ผลการศึกษาสภาวะพึ่งยาทางกายสอดคล้องกับข้อสังเกตของ Matin และคณะ (1963) ที่ว่า เมื่อให้หนูติดมอร์ฟีนแล้ว และหลังจากงดเสพ 8-16 ชั่วโมง หนูจะมีน้ำหนักและอุณหภูมิลดลงอย่างมาก อาการเช่นนี้อาจจะเกิดนานถึง 72 ชั่วโมง หลังงดเสพ หลังจากนั้นน้ำหนักและอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และผลการทดลองได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความสัมพันธ์ โดยตรงขององศาการดื้อยากับภาวะพึ่งยาทางกาย ซึ่งแสดงออกโดยใช้ค่า เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักหนู ซึ่งลดเมื่อให้หนูงดเสพยามอร์ฟีนหลังจากให้ติดยามีค่าองศาการดื้อยาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 5-300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (รูปที่ 10) ถึงแม้ว่า Way และคณะ (1969) ได้ทำการทดลองหาความสัมพันธ์ของการดื้อยา และภาวะพึ่งยาทางกายในหนูไมซ์ พบว่ามีความสัมพันธ์ของการดื้อยากับภาวะพึ่งยาทางกาย จนถึงขนาดมอร์ฟีน 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักหนู การทดลองนี้ก็เป็นการยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าไม่ว่าความดื้อยามอร์ฟีนในหนูจะสูงขึ้นไปมาก ๆ เพียงไรก็ตาม (มอร์ฟีน 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักหนู) ก็จะมีสภาวะพึ่งยาทางกาย เกิดควบคู่ไปด้วยตลอด และอัตราของการเกิดสภาวะพึ่งยาทางกาย จะสัมพันธ์โดยตรงกับอัตรา การเกิดการดื้อยา ซึ่งเกิดควบคู่กันไปโดยตลอดด้วย มีรายงานว่าสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น Cyclohexamide (Actidione) สามารถยับยั้งการเกิดภาวะการดื้อยาและภาวะพึ่งยาทางกายไปพร้อม ๆ กันด้วย (Loh และคณะ , 1968) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานว่าการสังเคราะห์ Serotinin ในสมอง ซึ่งพบว่ามีค่าสูงขึ้นในหนูดื้อยา ถ้าหากฉีด P-chlorophenalamine ซึ่งไปยับยั้งการสังเคราะห์ serotinin จะไปยับยั้งการดื้อยาและภาวะพึ่งยาทางกายอีกด้วย (Shen และคณะ, 1968; Way และคณะ ,1969) อย่างไรก็ตามมีผลการทดลองที่น่าสนใจ คือในขณะที่หนูได้รับยามอร์ฟีน เมื่อทำให้ติดยานั้นจะพบว่ารูปแบบของการเพิ่มน้ำหนักจะเหมือนกับหนูปกติทุกประการ และหนูซึ่งดื้อยาด้วย

องศาของการดื้อยาสูง จะมีผลกระทบต่อช่วงเวลาของการเกิดสภาวะพึ่งยาทางกายนานกว่าหนูซึ่งมีค่าองศาการดื้อยาต่ำกว่า Loh และคณะ (1969) ได้ศึกษาพบว่าการดื้อต่อยามอร์ฟีน อาจมีความสัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน หรือโพลีเปปไทดในสมอง จึงจะทำหน้าที่รับมอร์ฟีนในสมอง ดังนั้นในปี ค.ศ. 1965 Cohen และคณะ จึงได้ศึกษาผลของ Actinomycin D (ซึ่งเป็นสารซึ่งห้ามการสร้างโปรตีน) ต่อการดื้อยามอร์ฟีน และการทดลองพบว่า Actinomycin D สามารถลดอัตราเร็วของการพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนในหนู mice และ rat ซึ่งอาจเป็นผลจากมีการลดการสร้าง RNA ซึ่งมีผลต่อการสร้างโปรตีน หรือ เปปไทด์ (peptide) และจากการศึกษาของ Neto และ Carlini ในปี 1972 พบว่าเมื่อให้หนูซึ่งยังโตไม่เต็มที่ (Immature rat) ติดกัญชา จะพบว่า หนูจะพัฒนาการดื้อยาอย่างรวดเร็ว พร้อมกับพบว่าน้ำหนักของหัวใจและสมองของหนูติดกัญชาแบบเรื้อรัง จะลดลงด้วย ซึ่ง Leito และ Carlini (1974) ก็พบว่ามีการลดของน้ำหนักหัวใจและสมองในหนูติดกัญชาซึ่งโตเต็มที่ ดังนั้นในการวิจัยนี้ จึงได้ชั่งน้ำหนักของแต่ละส่วนของสมองของหนูที่ดื้อยาที่ค่าองศาการดื้อยาต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า หนูดื้อยามีค่าองศาการดื้อยาต่าง ๆ คือ 5, 9.8, 17, 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีน้ำหนักสมองในแต่ละส่วนคือ Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และ Cerebellum ไม่แตกต่างจากหนูปกติ (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ดีถึงแม้ว่าหนูทดลองจะติดยาด้วยค่าองศาการดื้อยามอร์ฟีน 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว แต่เนื่องจากระยะเวลาของการติดยาด้วยความเข้มข้น ดังกล่าวเพียง 2 วัน และระยะเวลาของการติดยา ทั้งหมดเพียง 18 วัน อาจไม่ทำให้หนูมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสมองแต่ละส่วน และ/หรือน้ำหนักสมองทั้งหมดอย่างเห็นได้ชัดก็ได้

ในการศึกษาระดับมอร์ฟีนในสมองหนูนั้น ได้ดัดแปลงจากวิธีหาปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะ ซึ่งเป็นวิธีของ Spector และ Parker (1970) โดยใช้มอร์ฟีนติดฉลากและแอนติบอดีเพียง ¼ ของที่บริษัทแนะนำ ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัด เมื่อเทียบกราฟมาตราฐาน ซึ่งมีมอร์ฟีนมาตราฐานละลายในสารละลายปัสสาวะ กับในสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า % bound ที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน ในสารละลายปัสสาวะมีค่าต่ำกว่าในสารละลายบัฟเฟอร์ เมื่อความเข้มข้นต่ำ ๆ แต่ที่ความเข้มข้นสูง (4 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง) ค่า % bound จะใกล้เคียงกัน อาจเป็นได้ว่าในสารละลายปัสสาวะมีสารอื่น ๆ ปนอยู่ ซึ่งมีผลต่อปฏิกริยา การจับกันระหว่างมอร์ฟีนติดฉลากกับแอนติบอดี ในการศึกษาปริมาณมอร์ฟีนในสมอง จึงเลือกใช้กราฟมาตราฐาน ซึ่งเตรียมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่เนื่องจากสารละลายที่สกัดจากสมองหนู อยู่ในสารละลาย

กรดเกลือ 0.1 นอร์มอล ดังนั้นจึงต้องใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้สูงพอที่จะช่วยรักษา pH ของสารละลายที่ใช้หาปริมาณมอร์ฟีนให้เป็นกลาง ดังนั้นจึงต้องศึกษาอิทธิพลของ pH และกำลังอิออน (Ionic strength) ต่อสารละลายซึ่งใช้วิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนมาตราฐาน จากการทดลองพบว่า กราฟมาตราฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟีน โดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ จะไม่แตกต่างกันเมื่ออยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 0.5 โมลาร์ และในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ตั้งแต่ 6 ถึง 8.35 เนื่องจากความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่สกัดจากสมองหนูมีปริมาณสูงกว่าค่าในกราฟมาตราฐานมาก ดังนั้นจึงต้องเจือจางลงให้ อ่านค่าได้จากกราฟมาตราฐาน จากการทดลอง พบว่าสามารถใช้สารละลายซึ่งสกัดจากสมองหนูปกติในการเจือจางได้ และใช้สารละลายสมองหนูเจือจางได้ถึง 1 ต่อ 128 เท่า โดยไม่มีผลต่อการวัดปริมาณมอร์ฟีนโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์เลย สังเกตได้จากค่าปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้กับจำนวนเท่าของการเจือจางยังมีความสัมพันธ์ เป็นเส้นตรง

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ โดยการศึกษาความไว (Sensitivity) ตามวิธีของ Abraham (1974) พบว่าความไวของวิธีวัดปริมาณเท่ากับ 0.1 นาโนกรัม/100 ไมโครลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความไว ซึ่งศึกษาโดย Spector and Parker (1970) ซึ่งใช้สารละลายสำเร็จรูปของบริษัท Roche ในการหามอร์ฟีนในปัสสาวะ ส่วนการทดสอบความแม่นยำนั้น พบว่ามีค่าความแปรปรวนเป็นที่น่าพอใจ คือ เมื่อทำการทดลองภายในการทดลองเดียวกัน และระหว่างการทดลอง ค่าความแปรปรวนจะเท่ากับ 4.64 และ 5.88% ตามลำดับ ค่าความถูกต้อง (accuracy) ซึ่งดูได้จาก % recovery ก็มีค่าสูงถึงเกือบ 100%

การศึกษาระดับมอร์ฟีนในแต่ละส่วนของสมองหนู โดยใช้สารละลายของบริษัท Roche พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะกับมอร์ฟีนและอนุพันธ์ของมอร์ฟีน เช่น โคเดอีน : มอร์ฟีนกลูคิวโรไนด์ และจากรายงานว่า เมื่อฉีดมอร์ฟีนเข้าไปในสมองจะพบอนุพันธ์ของมอร์ฟีน 3 ชนิด คือ ฟรีมอร์ฟีน (free morphine) , มอร์ฟีน-3-กลูคิวโรไนด์ และ non-acid hydrolysed conjugates (Bullock, และคณะ 1977) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า การศึกษาระดับมอร์ฟีน ในที่นี้ รวมถึงการศึกษาอนุพันธ์มอร์ฟีนทั้งหมด ในการวิจัยนี้ได้ศึกษา ทั้งการกระจายของมอร์ฟีนในสมองส่วนต่าง ๆ ทั้ง 5 ส่วน และศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของมอร์ฟีนในแต่ละส่วน ของสมองหนูเปรียบเทียบกัน เมื่อหนูติดยาแบบเรื้อรังด้วยค่า AD_{50} ต่าง ๆ คือ 5, 9.8, 17, 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยแบ่งสมองออกเป็นส่วน ๆ

ตามหน้าที่และตำแหน่ง รูปที่ 4ก. และ 4 ข. ตามวิธีของ เสาวนีย์ กาญจนชุมพล (1979) จะได้แต่ละส่วนของสมองมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย แตกต่างกันออกไป เมื่อศึกษารูปแบบการกระจายของมอร์ฟีนในสมองหนูปกติ (ติดยามอร์ฟีนแบบเฉียบพลันที่ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) กับรูปแบบการกระจายหลังจากหนูติดยาและดื้อยามอร์ฟีน ที่ต่างศาการดื้อยาต่าง ๆ กัน (ติดยามอร์ฟีนแบบเฉียบพลันที่ 9.8-300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) จะมีรูปแบบของการกระจายของมอร์ฟีนในแต่ละส่วนของสมอง ซึ่งวัดหลังจากฉีดมอร์ฟีนด้วยความเข้มข้นของค่า AD_{50} ต่าง ๆ นาน 40 นาที จะไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดมากนัก คือ ค่าเฉลี่ยของระดับมอร์ฟีน (นาโนกรัม/กรัมสมอง) จะมีค่าสูงสุดในสมองส่วน cerebellum ถัดไปคือ Cortex และส่วน Mid brain จะมีค่าเฉลี่ยของระดับมอร์ฟีนวัดได้ต่ำที่สุด ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Bullock และคณะ (1977) ซึ่งได้ศึกษาการกระจายของมอร์ฟีนและเมตาบอไลต์ ของมอร์ฟีน พบว่าสมองส่วน cerebellum จะมีมอร์ฟีน กลูคิวโรไนด์ และมอร์ฟีนอิสสระมากที่สุด และได้รายงานด้วยว่าสมองของหนูติดยาจะมีการ นำมอร์ฟีนเข้าสู่สมอง (uptake) น้อยกว่าหนูไม่ติดยาเมื่อได้รับมอร์ฟีนเท่ากัน Pert และ Snyder (1973) , Teschemacher และคณะ (1973) ได้เสนอแนะว่าสมองส่วน cerebellum ไม่น่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญในการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีน เมื่อเทียบกับสมองส่วนอื่น ๆ เช่น Medulla, Mid brain และ Striatum จากการศึกษาระดับรีเซพเตอร์ฝิ่น (opiate receptor) (Pert และ Snyder, 1973) พบว่า มีค่า Stereospecific binding ของ ^{3}H-naloxone (antagonist ของมอร์ฟีน) สูงที่สุดในสมองส่วน Striatum และปานกลางใน Mid brain ในขณะที่สมองส่วน Cerebellum จะมีจำนวนรีเซพเตอร์น้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หาระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน ซึ่งเชื่อว่าเป็นบริเวณที่มีการจับของมอร์ฟีนในสมองด้วยผลการทดลองพบว่า ระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน ในสมองหนูจะสูงที่สุดในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus รองลงไปคือส่วน Cortex, Mid brain, Pon & Medulla และสมองส่วนที่มีระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลินต่ำสุดเป็นส่วน Cerebellum (รูปที่ 35) Pert และ Snyder (1973) เสนอแนะว่าการที่พบระดับมอร์ฟีนในสมองส่วน Cerebullum สูงนั้นอาจเนื่องมาจากอัตราการไหลของเลือดผ่านบริเวณนี้สูงกว่าสมองส่วนอื่นหรืออาจเป็นผลเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของเนื้อเยื่อสมองส่วนนี้ก็เป็นได้

เมื่อเปรียบเทียบระดับมอร์ฟีนในแต่ละส่วนของสมองของหนูดื้อยาทั้งแบบเรื้อรังและเฉียบพลันหลังจากฉีดมอร์ฟีน 40 นาที จะพบว่า ระดับมอร์ฟีนในสมองแต่ละส่วนจะเพิ่มขึ้นจากกลุ่มที่มีค่า AD_{50} ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทุกค่า แสดงว่าเมื่อหนู

ได้รับมอร์ฟีนที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ไม่ว่าเป็นแบบเฉียบพลัน หรือเรื้อรังจะมีการนำเข้าของมอร์ฟีนสู่แต่ละส่วนของสมองเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้เมื่อนำมาพลอต หาความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ใช้เริ่มฉีด (หนูติดยาแบบเฉียบพลัน)(รูปที่ 24) หรือเมื่อพลอตระดับมอร์ฟีนที่หาได้ในแต่ละส่วนของสมอง กับค่า AD_{50} ของหนูที่ใช้ฉีด จนกระทั่งหนูพัฒนาการดื้อยาสมบูรณ์ (หนูติดยาแบบเรื้อรัง) (รูปที่ 23) จะเห็นได้ว่ารูปแบบของความสัมพันธ์ เป็นเส้นตรง ความสัมพันธ์นี้แสดงให้เห็นว่า ระดับของมอร์ฟีนกับค่า AD_{50} ซึ่งวัดได้โดยใช้ค่า การระงับปวด (analgesic effect) น่าจะมีความสัมพันธ์กันโดยตรง Patrick และคณะ 1975) ได้รายงานว่าเมื่อนำหนูปกติมาฉีดมอร์ฟีนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้ววัดค่าตอบสนองของการระงับปวด ในหนู (rat) และหนูไมซ์ จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณมอร์ฟีนในสมองอย่างเป็นเส้นตรง แต่ในการวิจัยนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่ว่าหนูปกติหรือหนูซึ่งดื้อยาแล้ว ที่ค่าองศาการดื้อยาเท่าไรก็ตาม (หนูติดยาแบบเฉียบพลัน) ระดับมอร์ฟีน ในสมองแต่ละส่วนทุกส่วนจะเพิ่มขึ้น เป็นปฏิภาคโดยตรงกับค่ามอร์ฟีนที่เริ่มฉีด Johannesson และ Schou (1963) รายงานว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับมอร์ฟีน กับค่าการตอบสนองต่อการระงับปวดเป็นเส้นตรง เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับมอร์ฟีนในสมองส่วนต่าง ๆ ระหว่างหนู ติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลัน จะสังเกตได้ว่าที่ค่าองศาการดื้อยาต่ำคือ 5 และ9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ระดับมอร์ฟีนในแต่ละส่วนของสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังจะสูงกว่าหนูได้รับยาแบบเฉียบพลันและเมื่อองศาของการดื้อยาสูงขึ้น คือ 17, 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ความแตกต่างนี้จะหมดไป ซึ่งอาจเป็นได้ว่าที่องศาการดื้อยาต่ำ ๆ มอร์ฟีนยังไม่มีการจับกับรีเซพเตอร์ฝิ่นอย่างอิ่มตัว เมื่อพัฒนาการดื้อยาโดยฉีดมอร์ฟีนขนาดเท่าเดิมไปจนกระทั่ง หนูพัฒนา ความดื้อต่อขนาดของมอร์ฟีนเดิมนั้นสมบูรณ์ (เวลาของการกระดิกหางลดลงเท่ากับหนูกลุ่มปกติ) มอร์ฟีนก็จะมีโอกาสไปจับกับรีเซพเตอร์ของฝิ่นได้เพิ่มมากขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นของมอร์ฟีนสูง ๆ รีเซพเตอร์ฝิ่นอาจจะอิ่มตัวแล้วก็ได้ จึงทำให้ระดับมอร์ฟีนในสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลันไม่แตกต่างกัน

วิธีสกัดเอ็นเคฟาลินจากสมองหนู ทำได้หลายวิธี เช่น ใช้สารละลายซูโครส 0.32 โมลาร์ (Simantov, และ Snyder, 1976) ใช้ 2 นอร์มอลอะซิติค แอซิด หรือกรดเกลือ 0.1 โมลาร์ (Miller และคณะ 1978) ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้กรดเกลือ 0.1 โมลาร์ ในการสกัดเพราะต้องการใช้สารละลายซึ่งสกัดได้นี้ไปหาปริมาณทั้งมอร์ฟีน และ เมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน ในขณะเดียวกัน

การเตรียมรีเซพเตอร์โปรตีนสำหรับหาปริมาณเอ็นเคฟาลิน ก็มีวิธีเตรียมหลายวิธีเช่นกัน เช่น วิธีของ Snyder (Snyder และ Pert, 1973) โดยใช้ Whole brain ยกเว้นCerebellum ซึ่งมีรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน หรือสารพวกฝิ่นน้อยมาก ในการวิจัยนี้ได้ลองเตรียมรีเซพเตอร์หลายวิธี พบว่าวิธีของ Chang และ Cuatrecasas (1979) จะให้ค่า Stereospecific binding ของ ^{3}H-เมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน สูงที่สุด ดังนั้นจึงได้เตรียมรีเซพเตอร์ตามวิธีดังกล่าว อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสีย เนื่องจากเป็นวิธี differentail Centrifugation ต้องปั่นล้างหลายครั้ง ดังนั้นจึงต้องใช้หนูจำนวนมากในการเตรียม

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการจับ กันระหว่าง ^{3}H-เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีน ซึ่งพบว่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 7 อุณหภูมิที่ทำให้มีการจับกันสูงสุดเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณของรีเซพเตอร์โปรตีนที่เหมาะสมเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัม เพราะถ้าใช้มากกว่านี้แล้ว จะมีปัญหาในการกรอง ^{3}H-เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลินที่เหมาะสมเท่ากับ 0.67 นาโนโมลาร์

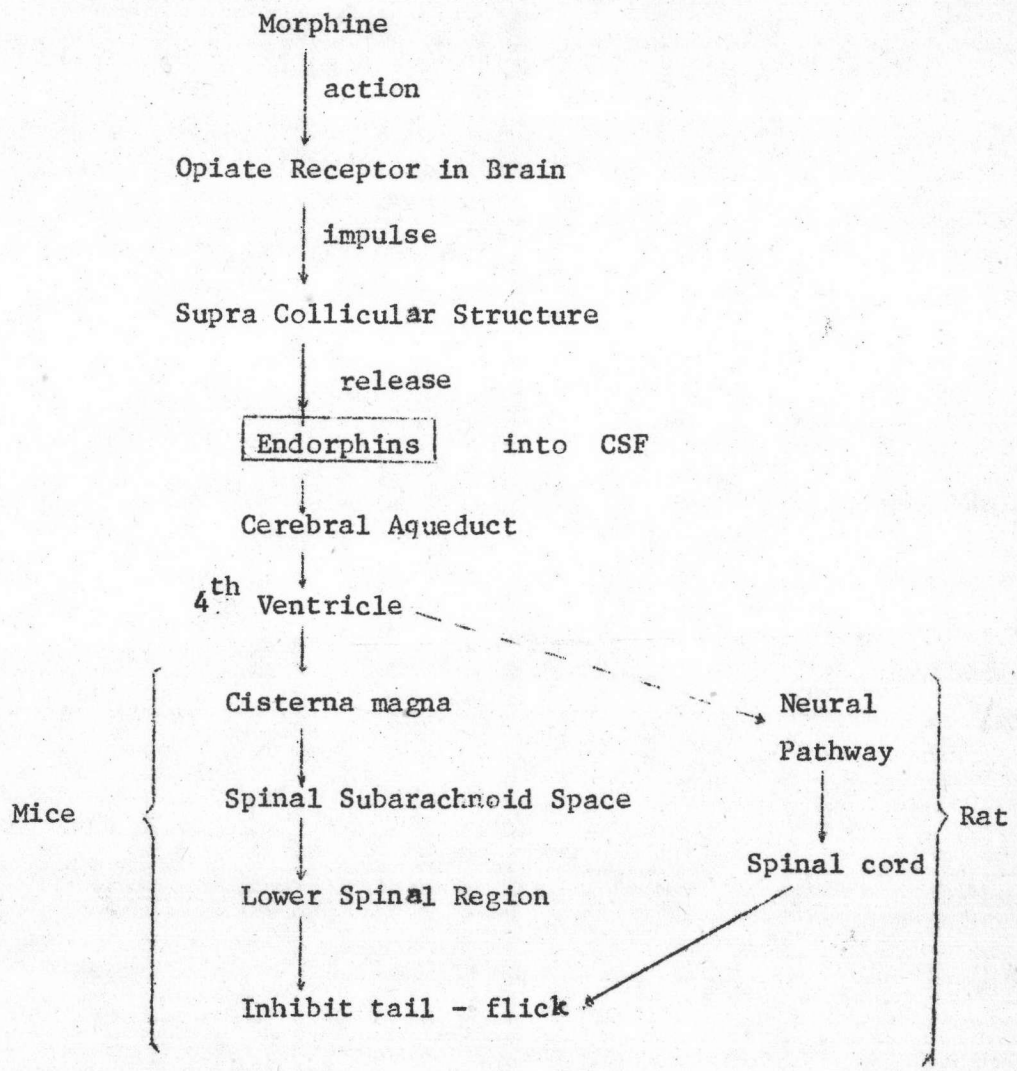
เนื่องจากในสมองหนูมีเอ็นไซม์ ที่จะทำลาย เอ็นเคฟาลินอยู่มากมาย เช่น aminopeptidase ดังนั้นจึงต้องเติมแบซิทราซินลงไปจับกับเอ็นไซม์เหล่านี้ ปริมาณแบซิทราซินที่เหมาะสมจากการทดลองเท่ากับ 118.8 ไมโครกรัม หรือเท่ากับ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการทดลองของ Simantov และคณะ (1978) พบว่าปริมาณ แบซิทราซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงพอที่จะป้องกันไม่ให้ ^{3}H-เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ถูกทำลาย และถ้า แบซิทราซิน สูงเกินไปจะมีผลไปห้าม ทำให้ ^{3}H-เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน จับกับรีเซพเตอร์โปรตีน ได้น้อยลง (Simantov และ Snyder,1976)

^{3}H-เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน จับกับรีเซพเตอร์ได้ 3 ลักษณะคือ Trapped and Dissolved, Nonspecific Binding และ Specific binding (Goldstain และคณะ , 1971) ดังนั้นในการทดลองจึงได้ศึกษาจำนวน Nonspecific binding โดยใช้มอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับหา nonspecific Binding เท่ากับ 10^{-5} โมลาร์

ผลการหาปริมาณเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนูปกติ โดยวิธี Competitive protein binding (หรือเรดิโอรีเซพเตอร์แอสเสย์) พบว่า สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus มีเอ็นเคฟาลินมากที่สุด ถึง

2613 ± 296 พิโคโมล/กรัมสมอง รองลงมาคือ Mid brain และ Pon & Medulla ซึ่งมีพอ ๆ กับ ส่วน Cerebellum จะมีปริมาณเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ต่ำที่สุดเท่ากับ 691 ± 114 พิโคโมล/กรัมสมอง Gros และคณะ (1978) ทำการศึกษาระดับเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลินในสมองหนู โดยวิธี เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ก็ได้รูปแบบการกระจายของเอ็นเคฟาลิน คล้ายกัน คือ สมองส่วน Hypothalamus จะมีเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน สูงสุด และ Cerebellum จะมีระดับต่ำสุด

Fu และ Deway (1979) ได้ตั้งสมมุติฐานของกลไกความสัมพันธ์ของมอร์ฟีนกับความสามารถในการระงับปวด ซึ่งวัดโดยคิดตามการกระดิกของหางที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน ว่าจะเกี่ยวข้องกับขบวนการต่าง ๆ ในสมองดังนี้



รูปที่ 37 กลไกการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวดของหนู

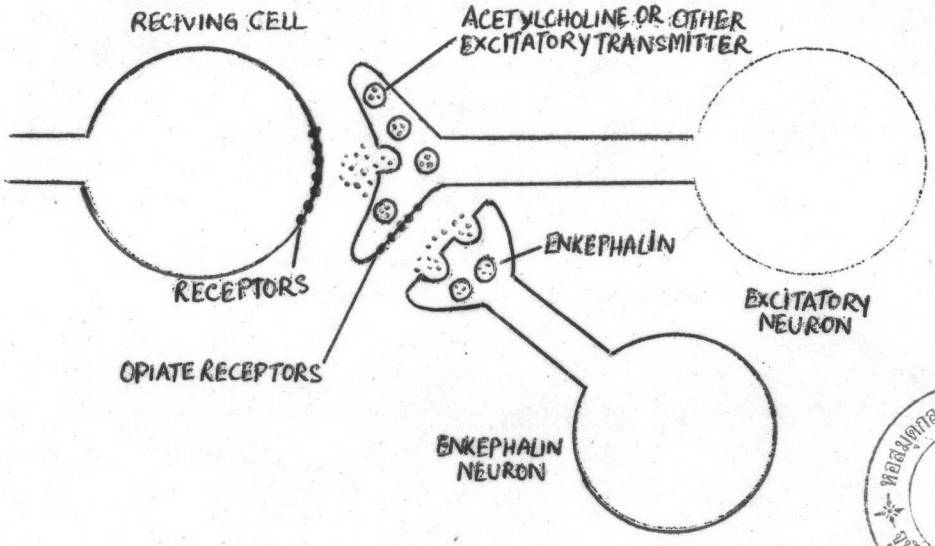
เมื่อหนูได้รับมอร์ฟีน มอร์ฟีนจะจับกับรีเซพเตอร์ของฝิ่น แล้วส่งการกระตุ้นไปยัง Supra-Collicular structures เช่น Hypothalamus หรือ Periaqueductal region แล้วกระตุ้นให้มีการหลั่ง เอ็นดอร์ฟีน (endorphin) เข้าไปใน cerebrospinal fluid (CSF) แล้วส่งต่อไปยัง 4th Ventricle endogenous substance นี้ จะออกฤทธิ์บริเวณรอบ ๆ 4th ventricle แล้วกระตุ้น Neural Pathway ใน spinal cord มีผลในการห้ามการกระดิกหางของหนู (Inhibit tail flick) นอกจากนี้มีผู้สนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับรีเซพเตอร์ในหนูติดยา เพื่อจะหากลไกของการพัฒนาการดื้อยาและติดยาในหนูอีกมากมาย Pert และคณะ (1973) พบว่าหลังจากฉีดมอร์ฟีนให้หนูแบบเฉียบพลัน หรือเรื้อรังนาน 5 นาที จะมีการเพิ่มระดับรีเซพเตอร์ ถึง 100% Frederickson และคณะ (1974) รายงานว่ามีการเพิ่มระดับของ รีเซพเตอร์ ของ ^{3}H-naloxone หรือ ^{3}H-dihydromorphine ในหนูซึ่งติดยาและดื้อยามอร์ฟีน แต่การเพิ่มจะเกิดหลังจากฉีดยา 25 ชั่วโมง Harris และ Rajmierowski (1975) ได้รายงานว่า หลังจากฉีดมอร์ฟีน 5 นาที พบการเพิ่มระดับของรีเซพเตอร์ ในสมองหนูหลังจากนั้น จะลดลงเท่าเดิมภายใน 2 ชั่วโมง และเมื่อฉีดต่อไปอีก 28 วัน จะไม่มีผลต่อระดับรีเซพเตอร์

ในปี 1974 Klee และ Streaty และ Hollt และคณะ (1975) ได้ศึกษาเกี่ยวกับรีเซพเตอร์ในหนูติดยา พบว่าไม่มีการเปลี่ยนระดับรีเซพเตอร์ หรือ binding affinity หรือความจำเพาะ (specificity) ของรีเซพเตอร์ ในสมองหนูติดยาหรือดื้อยา เมื่อเทียบกับหนูปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bonnet และคณะในปี 1976 ซึ่งรายงานว่าไม่มีการเปลี่ยนจำนวนรีเซพเตอร์ หรือ affinity ของการจับของ ^{3}H-naloxone ในสมองส่วน Periventricular gray หรือ medical Thalamus ของสมองหนูระหว่างพัฒนาการดื้อยา ในการวิจัยนี้ จึงได้สนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของรีเซพเตอร์ และค่า dissociation constant ในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนูติดยาแบบเรื้อรังด้วยค่องศาการดื้อยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยศึกษาทั้งในสมองแต่ละส่วน คือ Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และ Cerebellum และในสมองทั้งหมด (Whole brain) ผลการศึกษาพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับรีเซพเตอร์ของ เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน และค่า dissociation constant (K_d) ของการจับกันระหว่าง ^{3}H-เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ในสมองทั้งหมด ของหนูติดยาด้วยองศาการดื้อยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

แต่เมื่อศึกษาในสมองแต่ละส่วน พบว่า ระดับรีเซพเตอร์ของเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ในสมองส่วน Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain และ Cerebellum ของหนูติดยาที่ค่าองศาการดื้อยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะไม่แตกต่างจากหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สมองส่วน Pon & Medulla ของหนูติดยาที่องศาการดื้อยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีระดับของรีเซพเตอร์ของ เอ็นเคฟาลินแตกต่างกับ และแตกต่างจากหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า dissociation constant (K_d) ของการจับกันระหว่างเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์ในสมองของหนูติดยามอร์ฟีนด้วยค่าองศาการดื้อยาต่าง ๆ จะเห็นได้ว่า ค่า K_d ของรีเซพเตอร์ของเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ในสมองหนูติดยามอร์ฟีน ด้วยค่าองศาการดื้อยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในสมองส่วน Thalamusและ Hypothalamus จะลดต่ำลงจากสมองหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีความแตกต่างในระหว่างหนูติดยาด้วยกัน และในสมองหนูติดยามอร์ฟีน ส่วน Mid brain ก็จะมีค่า K_d ของรีเซพเตอร์เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ต่ำกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ เช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น ค่า K_d ของรีเซพเตอร์ของเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ในสมองส่วน Mid brain ในหนูที่ติดยามอร์ฟีน ด้วยค่าองศาการดื้อยา 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีค่าต่ำกว่าหนูที่ติดยามอร์ฟีนด้วยค่าองศาการดื้อยา 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าเมื่อหนูติดยามอร์ฟีนด้วยค่าองศาการดื้อยาสูงขึ้น จะมีการเปลี่ยนแปลงของ affinity ของการจับกันระหว่างรีเซพเตอร์ กับเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน ในทิศทางที่จะทำให้ affinity ของการจับกันได้ดีขึ้น เนื่องจากการออกฤทธิ์ทางเภสัชของมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลิน เหมือนกัน (agonist) (Teschemacher และคณะ, 1975) และ Snyder (1977) ได้เสนอแนะว่า เอ็นเคฟาลินทำหน้าที่เป็น inhibitory neurotransmitter ในสภาวะปกติจะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ประสาทที่เรียก enkephalin neuron และจะจับกับรีเซพเตอร์ผื่น แล้วทำให้มีการหลั่งของ excitatory transmitter ลดลง ดังนั้นการกระตุ้น (impulse) ที่จะเข้าสู่เซลล์ลดน้อยลง จึงเกิดการระงับปวดได้ที่ระดับหนึ่ง ถ้าฉีดมอร์ฟีนเข้าไป รีเซพเตอร์ผื่นจะจับทั้งผื่นและเอ็นเคฟาลิน ทำให้ผลของการระงับปวดได้มากกว่าเดิม แต่เมื่อฉีดมอร์ฟีนบ่อย ๆ อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากมี negative feed back จากรีเซพเตอร์ผื่น ซึ่งอาจมีผลทำให้มีการหลั่งเอ็นเคฟาลินลดลง เพื่อให้ระดับของการระงับปวดลดลง ในภาวะนี้คือภาวะของการดื้อยา ซึ่งมีผลทำให้ความต้องการมอร์ฟีนมากขึ้น



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 38 โมเดล แสดงกลไกของการดื้อยามอร์ฟีน ซึ่งสัมพันธ์กับเอ็นเคฟาลิน และรีเซพเตอร์ผิ่น (Snyder, 1977)

เพื่อให้การระงับปวดเท่าเดิม Collier (1966) ได้เสนอสมมุติฐานว่า การดื้อยามอร์ฟีน น่าจะเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระดับรีเซพเตอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Way และคณะ (1969) ที่ว่าการที่หนูติดยาเพิ่มขึ้น จำเป็นต้องใช้ antagonist ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ในการกำจัดการติดยา Shem และ Way (1975), Wary และ Loh (1976) ได้รายงานว่า เมื่อฉีด naloxone ซึ่งเป็น antagonist ของมอร์ฟีนเข้าไปในหนู จะมีระดับมอร์ฟีนในสมองลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าการจับกันระหว่างรีเซพเตอร์กับมอร์ฟีนสามารถถูกแทนที่ได้ แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ affinity ของรีเซพเตอร์ เมื่อหนูติดยามากขึ้น

ในการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นชัดว่า เมื่อทำให้หนูติดยามอร์ฟีนด้วยค่าองศาการดื้อยาสูง ๆ (32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) กินเวลา 10 วัน และ 18 วัน ตามลำดับ แล้ววิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของรีเซพเตอร์ พบว่า ระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลินสูงขึ้นในสมองหนูดื้อยาส่วน Pon & Medulla และมีการลดลงของค่า K_d ในสมองหนูดื้อยา ส่วน Mid brain และ Thalamus & Hypothalamus เมื่อศึกษาระดับของเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน และรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลินในสมองหนูปกติ เปรียบเทียบกันแล้วจะเห็นว่า สมองส่วน Thalamus & Hypothalamus, Mid brain รวมทั้ง Pon & Medulla จะมีระดับเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลินสูง ยิ่งไปกว่านั้นสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus

จะมีระดับรีเซพเตอร์ของเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลินสูงที่สุดอีกด้วย Cortex และ Mid brain จะมีระดับรีเซพเตอร์รองลงมา ขณะที่ Pon & Medulla จะมีระดับรีเซพเตอร์ค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคของ Autoradiograph (Pert และคณะ , 1976) เพื่อดูตำแหน่งที่ ^{3}H-dihydromorphine ซึ่งฉีดเข้าไปในหนู พบว่าส่วนต่าง ๆ ของสมองส่วนกลางหลายส่วน ซึ่งเกี่ยวข้องในการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีน โดยเฉพาะบริเวณของ Amygdala, Periaqueductal gray ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับเรื่องของอารมณ์ การรู้สึกเจ็บปวดตามลำดับ เป็นบริเวณที่มีการสะสมของกัมมันตภาพรังสีมอร์ฟีนสูง และยังมีบริเวณที่สะสมของมอร์ฟีนสูงอีก คือส่วน Periventricular gray ในการแบ่งสมองแบบนี้จะได้ส่วน Anygdala อยู่ในส่วนของ Hypothalamus และ Periaqueductal gray อยู่ในส่วนของ Mid brain ส่วนที่เรียกว่า Periventricular gray จะอยู่ในส่วนของ Medulla จากรายงานของเสาวนีย์ กาญจนชุมพล (1979) ได้พบว่าในหนูซึ่งติดยาด้วยองศาการดื้อยา 33 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีการลดลงของระดับ Cyclic AMP จากกลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla รวมทั้ง Cerebellum ด้วย จะเห็นได้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน ซึ่งสมองส่วนนี้จะมีส่วนของ Periventricular gray ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเกาะของมอร์ฟีนสูงอยู่ด้วย และในสมองส่วน Cortex ก็จะมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนรีเซพเตอร์ ของเอ็นเคฟาลินเช่นกัน แต่เนื่องจากสมองส่วนนี้ไม่มีส่วนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนโดยตรง จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มระดับของรีเซพเตอร์ (ฟิโคโมล/กรัมสมอง) อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน ซึ่งสังเคราะห์ในสมองหลังจากหนูดื้อยาแล้วก็เป็นได้

ที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือการเปลี่ยนค่า affinity ของการจับกันระหว่างรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน ต่อเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน (K_d ลดลง) อย่างเด่นชัดในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ Anygdala ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมอารมณ์ และ Mid brain ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ Periaqueductal gray ทำหน้าที่ควบคุมความรู้สึกเจ็บปวด การลดลงของค่า K_d แสดงให้เห็นว่าการจับกันระหว่าง เอ็นเคฟาลินและรีเซพเตอร์ แน่นมากขึ้น อาจเป็นตัวอธิบายเหตุผลว่า เพราะเหตุใด จึงต้องใช้มอร์ฟีนจำนวนมากขึ้น เพื่อไปแย่งที่การจับกันของรีเซพเตอร์กับเอ็นเคฟาลิน จากรายงานของ Simantov และคณะ (1978) พบว่าในสมองหนูปกติ สารเมทไธโอนีนจะจับกับรีเซพเตอร์ ได้ดีกว่า มอร์ฟีนไม่ต่ำกว่า 20 เท่า Mayer และคณะ (1977) ได้รายงานว่ามอร์ฟีนในสมองหนูปกติ เมื่อฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนัง และสมองของหนูดื้อยาโดยการฝังเม็ดมอร์ฟีน 75 มิลลิกรัม

เข้าในส่วนหลังของหนูนาน 3 วัน เมื่อนำเอาเม็ดมอร์ฟีนออกแล้ว มอร์ฟีนซึ่งจับอยู่กับสมองหนูจะไม่สามารถถูกไล่ที่ด้วย naloxone ได้เลย ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานของ Klee และ Streaty (1974) ซึ่งใช้หนูดื้อยาโดยฝังเม็ดมอร์ฟีน 75 มิลลิกรัม นาน 3-4 วัน นำเอารีเซพเตอร์สมองไปอินคิวเบทกับ ^{3}H-dihydromorphine จะไม่พบความแตกต่างของการจับกันระหว่าง ^{3}H-dihydromorphine กับรีเซพเตอร์ที่แยกจากสมองหนูปกติ และสมองหนูดื้อยาเลย จะสังเกตุได้ว่าการทดลองซึ่งในรายงานมาในอดีตทั้งหมด เป็นการทำให้หนูดื้อยาด้วยวิธีที่แตกต่างกัน อีกทั้งระยะเวลาของการดื้อยาก็สั้น ๆ การทำให้หนูดื้อยาโดยการฝังเม็ดมอร์ฟีน ไว้ใต้ผิวหนังจะมีผลให้มอร์ฟีนค่อย ๆ ซึมออกมาสู่กระแสโลหิต และไปยังสมอง และปริมาณมอร์ฟีนที่ซึมออกมานี้ ไม่สามารถควบคุมได้แน่นอน และเมื่อทำการวัดระดับมอร์ฟีนในสมองหนูซึ่งฝังเม็ดมอร์ฟีน 75 มิลลิกรัม นั้น จะให้ระดับมอร์ฟีนในสมองหนูสูงสุด หลังจากฝังนาน ประมาณ 12-24 ชั่วโมง (Patrick และคณะ 1975) ซึ่งถ้าเปรียบเทียบวิธีการพัฒนาการดื้อยา ซึ่งใช้ในการวิจัย จะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนว่าความเข้มข้นของมอร์ฟีน ซึ่งใช้ในการทดลองที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ จะใช้ความเข้มข้นของมอร์ฟีนสูงกว่าหลายเท่า และเวลาที่ให้หนูสัมผัสกับยาก็นานกว่าหลายเท่าด้วยเช่นกัน

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. สามารถพัฒนาให้หนูติดยามอร์ฟีน มีค่าองศาการดื้อยาซึ่งวัดด้วยค่า AD_{50} เริ่มตั้งแต่ 5, 9.8, 17, 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

2. เมื่อให้หนูงดเสพ เบอร์เซนต์ น้ำหนักลดจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับค่าองศาการดื้อยา

3. ระดับมอร์ฟีนในสมองส่วนต่าง ๆ คือ Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และ Cerebellum ของหนูติดยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลัน มีระดับเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วน โดยตรงกับค่าองศาการดื้อยาที่เพิ่มขึ้น และสมองส่วน Cerebellum จะมีระดับมอร์ฟีนสูงสุด

4. หนูดื้อยาด้วยความเข้มข้นของมอร์ฟีน 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีการเพิ่มระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน ในสมองส่วน Pon & Medulla เมื่อเทียบกับสมองหนูปกติ

5. ค่า dissociation constant (K_d) ของการจับกันระหว่าง เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์ในสมองหนู จะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนในสมองหนูส่วน Thalamus & Hypothalamus และ Mid brain ของหนูดื้อยาแบบเรื้อรัง ต่อมอร์ฟีนความเข้มข้น 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว