หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลายสำหรับฉีดหนู

3.1.1.1 สารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร (อบในหม้อนึ่ง ฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)

3.1.1.2 สารละลายมอร์ฟีน

ละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ ด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

3.1.2 สารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

3.1.2.1 สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 12.5 กรัม และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ด้วยไฟอ่อน ๆ 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเทียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ป้องกันแสง ก่อนใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

3.1.2.2 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

ประกอบด้วย สารละลาย 1% คิวปริก ซัลเฟต 1 มิลลิลิตร

สารละลาย 2% โซเดียม-โปแตสเซียม ทราเทรท 1 มิลลิลิตร
สารละลาย 2% โซเดียมคาร์บอเนต ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร

3.1.2.3 สารละลายโปรตีนมาตราฐาน

ชั่ง Bovine serum albumin 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร

3.1.3 สารละลายสำหรับสกัดมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลิน

3.1.3.1 กรดเกลือ 0.1 โมลาร์

ใช้กรดเกลือเข้มข้น 4.364 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3.1.4 สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอ็นเคฟาลิน

3.1.4.1 0.32 โมลาร์ ซูโครส

ชั่ง ซูโครส 54.8 กรัม ละลายน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3.1.4.2 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7

ชั่งทรีส 3.035 กรัม ละลายน้ำประมาณ 400 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ด้วยกรดเกลือ ให้ได้เท่ากับ 7.7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3.1.4.2 สารละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 10^{-5} โมลาร์

ชั่งมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 0.075168 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้มอร์ฟีนความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3} โมลาร์ ต่อไปเอามอร์ฟีน 10^{-3} โมลาร์ นี้มาเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:10 จนได้ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์

3.1.4.3 การเตรียมสารละลาย เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน

ชั่งเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน 0.011474 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน 10^{-4} โมลาร์ เวลาจะใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน 1:10 ต่อไป จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

3.1.4.4 การเตรียมสารละลายแบซิทราซิน

ชั่งแบซิทราซิน 0.01188 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร เวลาใช้ดูดมาครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร จะได้แบซิทราซิน 118.8 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง

3.1.4.5 การเตรียม ^{3}H-เมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลิน

[Tyrosine - 3,5 ^{3}H] enkephalin (5-L-methionine) ที่ซื้อมามี Specific activity 0.38 Ci/m mol M.W. เท่ากับ 576 ความเข้มข้น 1 m Ci/ml. ละลายอยู่ใน 0.02 M โซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ซึ่งมี 2% เมอแคปโตแอทานอล เวลาใช้ดูดสารละลายนี้ขึ้นมา 10 ไมโครลิตร เป่าให้แห้ง โดยใช้แก๊สไนโตรเจน แล้วเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์

ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เวลาใช้ดูดมาครั้งละ 100 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้น เท่ากับ 0.67 นาโนโมลาร์ หรือประมาณ 60,000 cpm (53% efficiency)

3.1.5 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์มอร์ฟีน

3.1.5.1 เตรียม 0.01 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 250 มิลลิลิตร ใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งมี 0.1% โซเดียมอะไซด์

ชั่งโซเดียมไดไฮโดรแจนฟอสเฟต 0.1511 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2173 กรัม ละลายในน้ำประมาณ 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม และโซเดียมอะไซด์ 0.1 กรัม ละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่เตรียม ให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.5.2 เตรียมสารละลายมอร์ฟีนมาตราฐาน 0-40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 0.01 กรัม เจือจางให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จะได้มอร์ฟีนความเข้มข้น 1มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

3.1.6 การเตรียม Toluene Base Scintillation Fluid Triton X-100

ชั่ง 2,5-Diphenyloxazole (PPO) 7.3 กรัม
1,4-Bis-(5-phenyl-2 Oxazolyl)-benzole (POPOP) 0.167 กรัม
Triton X-100 250 มิลลิลิตร
เติมให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร ด้วย Toluene

3.2 การเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง

ใช้หนูขาวตัวผู้ พันธุ์ Charles Foster น้ำหนักเฉลี่ย 300 กรัม (280-320 กรัม) อายุประมาณ 3-4 เดือน ได้จากการเพาะพันธุ์และเลี้ยงเองในห้องทดลองปรับอากาศของภาควิชาชีวเคมีคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับน้ำประปาและอาหารสำเร็จ ซื้อจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ตลอดเวลา

3.3 การให้มอร์ฟีนและ 0.85% โซเดียมคลอไรด์

สำหรับหนูกลุ่มทดลองจะฉีดสารละลายมอร์ฟีนความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร โดยแบ่งฉีดเป็น 2 ครั้ง ในเวลาติดกัน ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร และฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Subcutaneous) ตรงเส้นกลางหลัง ช่วงระหว่าง Thoracic กับ Lumbar (Gebhart และ Mitchell, 1973)

หนูกลุ่มควบคุม ใช้วิธีฉีดเช่นเดียวกับหนูกลุ่มทดลอง แต่ใช้สารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ แทนสารละลายมอร์ฟีน

3.4 วิธีทดสอบการระงับปวด (Analgesic response) ของหนู (Cochin, 1968, Grotto และ Sulman 1967)

เนื่องจากมอร์ฟีนมีคุณสมบัติทางเภสัชเป็นยาระงับปวด (analgesic drug) ดังนั้นจึงสามารถติดตามการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนได้โดยการทดสอบการระงับปวด ในที่นี้จะใช้สังเกตการตอบสนองของหางหนู เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อนเป็นตัวชี้วัด

ทำการทดลองโดยใช้เครื่องมือทำด้วยไม้ และฟองน้ำเป็นตัวบังคับให้หนูอยู่นิ่ง และให้ปลายหางหนู จุ่มในน้ำในอ่างซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 58 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จุ่มลึก 1 - 1.5 เซนติเมตร จับเวลาตั้งแต่เริ่มจุ่มหางหนูลงน้ำ จนกระทั่งหนูกระดิกหางขึ้นจากน้ำ ค่านี้เป็นค่าควบคุมก่อนฉีดมอร์ฟีนให้หนู หลังจากฉีดสารละลายมอร์ฟีนเข้าหนูแล้วนาน 40 นาที รีบนำหนูไปทดสอบการตอบสนองของหางใหม่ หากเวลาที่หางหนูเริ่มจุ่มในน้ำร้อนจนกระทั่งหนูกระดิกหางขึ้นนานเกิน 10 วินาที ถือว่าเกิดการระงับปวดอย่างสมบูรณ์ (complete analgesia)

หนูกลุ่มควบคุม ทำการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง แต่ฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ แทนสารละลายมอร์ฟีน

3.5 วิธีหาค่า Median Analgetic Dose (AD_{50}) (Finney, 1962, Gebhart และ Mitchell 1973)

ค่า AD_{50} หมายถึงปริมาณมอร์ฟีนที่ฉีดเข้าไปในหนูทดลอง แล้วทำให้ 50 เปอร์เซนต์ ของหนูทั้งหมดเกิดการระงับปวดสมบูรณ์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำร้อนที่

58 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ซึ่งทำการทดลองได้โดยฉีดมอร์ฟีนที่ทราบปริมาณแน่นอน 3 ค่า เข้าไปในหนู 3 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว ตามวิธีข้อ 3.3 ปริมาณมอร์ฟีนที่ใช้จะต้องมีขนาดพอเหมาะที่จะทำให้การตอบสนองของหางหนูเป็นค่าการระงับปวดสมบูรณ์ระหว่าง 10-90% หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า AD_{50} โดยเปลี่ยนค่าเปอร์เซนต์ การระงับปวดสมบูรณ์ เป็นค่าทางสถิติ คือ Probit (Goldstein และ Kalman, 1968) และเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนให้เป็นค่าลอการิธึม นำค่าทั้ง 3 มาเขียนกราฟ จะได้ภาพเส้นตรงลากผ่านทั้ง 3 จุด (โดยใช้สมการ Linear regression) คำนวณค่า AD_{50} โดยถือหลักว่า ค่า AD_{50} คือค่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ให้ค่า probit เท่ากับ 5.0

3.6 <u>การพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนในหนู</u>

ชั่งน้ำหนักหนูก่อนทำการทดลอง 1 วัน แล้วหาน้ำหนักเฉลี่ย เพื่อนำไปคำนวณปริมาตรของมอร์ฟีนที่จะใช้ฉีด เริ่มทำการทดลองโดยฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร ให้หนูกลุ่มควบคุมทุกตัว และฉีดมอร์ฟีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ให้หนูกลุ่มทดลองยาทุกตัว โดยฉีดวันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง (6.30 และ 18.30 น.) ทดสอบการระงับปวดทุกเช้าหลังฉีดมอร์ฟีนแล้ว 40 นาที และชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวก่อนฉีดมอร์ฟีนตอนเย็นทุกวัน ทำการทดลองเช่นนี้ทุกวันจนกระทั่งพบว่าเวลาของการตอบสนองของหางหนูสู่ปกติ (ช่วงเวลาที่หางหนูจุ่มน้ำจนกระดิกขึ้น เท่ากับค่าควบคุม (ก่อนฉีดมอร์ฟีน))ถือได้ว่าหนูดื้อยามอร์ฟีนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จึงนำไปหาค่า AD_{50} ตามวิธีที่ 3.5 ในวันรุ่งขึ้น และใช้ค่า AD_{50} ที่ได้ฉีดให้หนูกลุ่มที่เหลือ ฉีดมอร์ฟีนปริมาณเดิมนี้ทุกวันวันละ 2 ครั้ง จนกระทั่งเมื่อนำหนูกลุ่มที่เหลือไปทำการทดสอบการระงับปวด โดยดูจากค่าเวลาของการตอบสนองของหางหนูลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุม จึงนำหนูกลุ่ม 2 ไปหาค่า AD_{50} แล้วนำค่า AD_{50} จากหนูกลุ่ม 2 นี้ ไปฉีดให้หนูกลุ่มที่เหลือต่อไป ทำการทดลองแบบนี้ไปเรื่อย ๆ จนหนูดื้อยามอร์ฟีนสูงตามต้องการ

3.7 <u>การศึกษาภาวะพึ่งยาทางกายของหนูติดมอร์ฟีนแบบเรื้อรังด้วยค่าองศาการดื้อยาต่าง ๆ</u>

พัฒนาให้หนูติดยามอร์ฟีนความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 5, 9.8, 17, 32.5 และ 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามวิธีข้อ 3.6 โดยฉีดมอร์ฟีนเช้า-เย็น (6.30 และ 18.30 น.) ชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวก่อนฉีดมอร์ฟีนตอนเย็น (17.30 น.) ทุกวัน หนูกลุ่มแรกงดเสพ เมื่อหนูได้รับมอร์ฟีนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ครบ 3 วัน และชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวตอนเย็นต่อไปอีก 10 วัน หนูกลุ่ม 2,3,4,และ 5 งดเสพ เมื่อหนูได้รับมอร์ฟีนความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 9.8, 17, 32.5 และ 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ครบ 4วัน 3 วัน 4วัน และ 2 วัน ตามลำดับ และชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวหลังจากงดเสพต่ออีก

10 วัน เช่นเดียวกัน

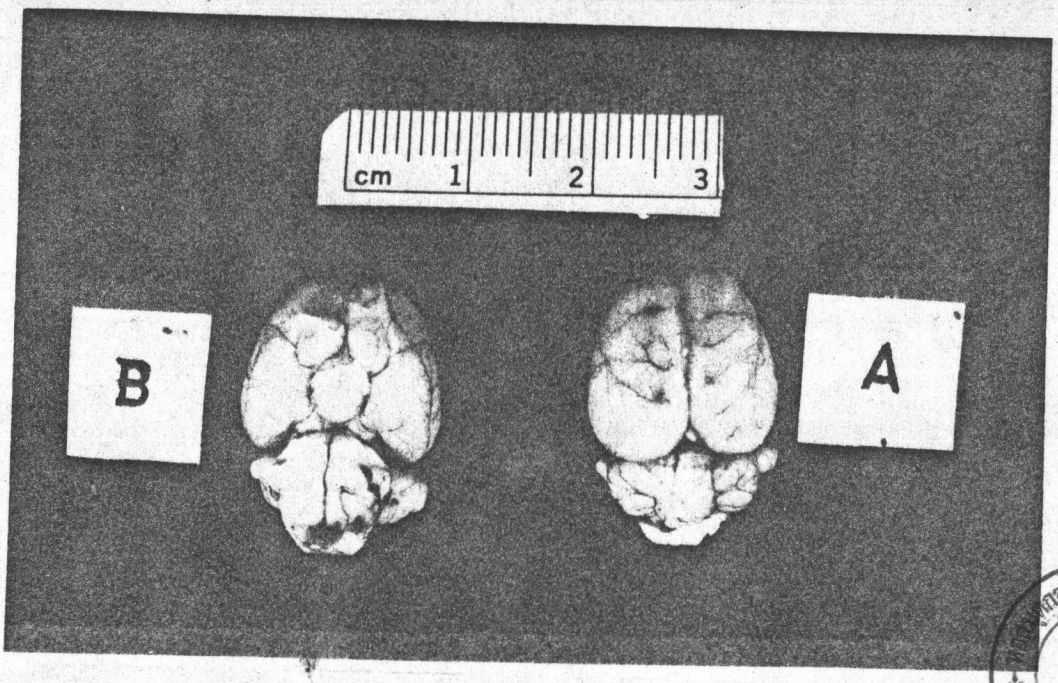
คำนวณหาค่าเปอร์เซนต์ของน้ำหนักลดโดยเทียบจากน้ำหนักวันสุดท้ายก่อนงดเสพยามอร์ฟีน

3.8 <u>การเตรียมสัตว์ทดลองสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลินในสมองหนู</u>

<u>หนูกลุ่มติดยาแบบเรื้อรัง</u> ชุดแรกใช้หนู 30 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ในแต่ละกลุ่มแบ่งเป็นหนูควบคุม 2 ตัว และหนูทดลองยา 3 ตัว หนูควบคุมฉีดด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ตลอดการทดลอง หนูทดลองยาฉีดด้วยมอร์ฟีน ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เริ่มด้วยการฉีดมอร์ฟีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ให้กับหนูทดลองยาทั้ง 18 ตัว และฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ให้กับหนูควบคุมทั้ง 12 ตัว โดยฉีดวันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ หรือมอร์ฟีนครั้งสุดท้ายครบ 40 นาที แล้วฆ่าหนูกลุ่มที่ 1 โดยการตัดคอ แบ่งสมองหนูที่ได้ออกเป็น 5 ส่วน คือ Cortex ,Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และ Cerebellum (เสาวณีย์ กาญจนชุมพล 1979) นำมาชั่งน้ำหนักแล้วถ่ายใส่หลอดทดลอง (แช่น้ำแข็ง) ซึ่งมีกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล อยู่ นำไปสกัดมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลิน ตามวิธีข้อ 3.10 ส่วนหนูทดลองยาที่เหลือ เพิ่มความเข้มข้นของมอร์ฟีนเป็น 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ฉีดนาน 4 วัน ฆ่าหนูกลุ่มที่ 2 หลังจากฉีดมอร์ฟีนครั้งสุดท้าย 40 นาที นำสมองไปสกัดมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลิน เช่นเดียวกับหนูกลุ่ม 1 ทำการเพิ่มองศาการดื้อยาด้วยวิธีเดียวกัน โดยการฉีดมอร์ฟีนความเข้มข้น 17 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นาน 3 วัน 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นาน 4 วัน 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นาน 2 วัน และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นาน 2 วัน ฆ่าหนูและแบ่งสมองออกเป็นส่วน ๆ เพื่อนำไปสกัดมอร์ฟีน และเอ็นเคฟาลินต่อไป

หนูกลุ่มติดยาแบบเรื้อรังชุดที่ 2 ทำเช่นเดียวกับชุดแรก ฉะนั้นเมื่อเตรียมตัวอย่างครบทั้ง 2 ชุดแล้ว จะได้หนูทดลองติดยาด้วยองศาการดื้อยาต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 6 ตัว และหนูควบคุม 4 ตัว

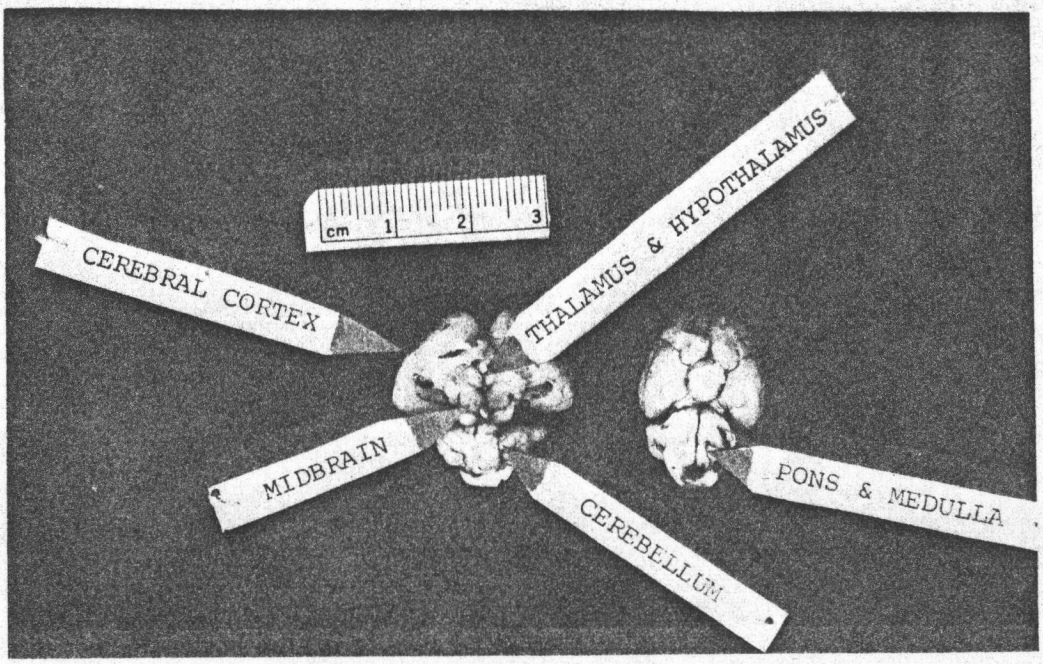
<u>หนูกลุ่มติดยาแบบเฉียบพลัน</u> ใช้หนูทั้งหมด 30 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว เริ่มด้วยการฉีดมอร์ฟีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ให้กับหนูทุกตัว แล้วฆ่าหนูกลุ่มแรกหลังจากฉีดยาครบ 40 นาที แล้วนำสมองไปแบ่งเป็นส่วน ๆ และสกัดมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลินต่อไป หนูที่เหลือฉีดมอร์ฟีน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อจนครบ 3 วัน วันที่ 4 เพิ่มความเข้มข้นของยาโดยฉีดมอร์ฟีน 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และฆ่าหนูกลุ่มที่ 2 หลังจากฉีดยา 40 นาที หนูที่เหลือฉีดมอร์ฟีน 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อจนครบ 4 วัน วันที่ 5 เปลี่ยนความเข้มข้นของมอร์ฟีนเป็น



ห้องสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ

ภาพถ่ายของสมองหนู

A. ด้านบน (dorsal view) B. ด้านล่าง (ventral view)



ภาพถ่ายแสดงส่วนต่าง-ของสมองหนู(rat) 5ส่วน ซึ่งใช้วัดระดับมอร์ฟีน

17 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และฆ่าหนูกลุ่มที่ 3 หลังจากฉีดยา 40 นาที หนูกลุ่มที่เหลือก็ให้มอร์ฟีนแบบเดียวกันนี้ต่อไป และฆ่าหนูหลังจากได้รับมอร์ฟีนความเข้มข้น 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ครั้งแรกนาน 40 นาที ตามลำดับ

3.9 <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u> (Lowry และคณะ 1951)

สารละลายที่จะใช้วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry มีดังนี้

สารละลาย A ประกอบด้วย 2% โซเดียมคาร์บอเนต ซึ่งละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

สารละลาย B 1% คอปเปอร์ซัลเฟต และ 2% โซเดียม-โปแตสเซียมทราเทรท ละลายในน้ำ

สารละลาย C ได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร กับ 1% คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 มิลลิลิตร และ 2% โซเดียม-โปแตสเซียม ทราเทรท 0.5 มิลลิลิตร

สารละลาย D เจือจางสารละลายฟีนอล ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

ใช้สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย C 3 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติม สารละลาย D 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ 650 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้ bovine serum albumin 0-100 ไมโครกรัม/0.1 มิลลิลิตร

3.10 <u>วิธีสกัดมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลินจากสมองหนู</u> (Miller และคณะ 1978)

หลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนังหนูทดลองเป็นเวลา 40 นาที แล้วรีบฆ่าหนูโดยการตัดคอ (decapitation) ล้างด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 ที่เย็น แล้วแบ่งสมองออกเป็นส่วนต่าง ๆ 5 ส่วน คือ Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain Pon & Medulla และ Cerebellum รีบนำสมองแต่ละส่วนนี้ไปชั่งน้ำหนัก แล้วแช่ในกรดเกลือ 0.1 โมลาร์ที่เย็น (อัตราส่วน 1:5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) บดด้วยไฮโมจีไนเซอร์ชนิดใช้มือ โดยชักลูกสูบขึ้นลง 40 ครั้ง นำไปปั่นที่ 50,000×g 1 ชั่วโมง ดูดส่วนใสเก็บไว้ นำตะกอนมาสกัดด้วยกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล ซ้ำอีกครั้งหลังจากปั่นแล้ว นำส่วนใสทั้ง 2 ครั้งมารวมกัน แล้วกรองผ่านใยแก้ว (glass wool) หลังจากปรับให้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายสมองแต่ละส่วนคงที่ด้วยกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล สมองส่วน Cortex ปรับปริมาตรเป็น 22 มิลลิลิตร ส่วนอื่น ๆ คือ Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และCerebellum

ปรับให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายตัวอย่างของสมองออกเป็น 2 ส่วน สำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟีนและเอ็นเคฟาลิน ตัวอย่างส่วนที่จะวิเคราะห์หามอร์ฟีน เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่าง ซึ่งจะวิเคราะห์หาปริมาณเอ็นเคฟาลิน นำไป lyophilized แล้วนำมาเติมกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล 2 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 7.4 โดยใช้สารละลาย 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไป Lyophilized และเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูทดลองโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

3.11.1 ศึกษากราฟมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะ

ใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Roche แต่ใช้ปริมาณของแอนติบอดี และสารติดฉลากเพียง 1/4 ของที่บริษัทแนะนำ ใส่สารต่าง ๆ ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในการหาปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

สารละลาย	หลอดทดลอง	
	ศูนย์ (µl)	สารมาตรฐาน (µl)
มอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะของบริษัท (1.25-40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	-	100
มอร์ฟีนติดฉลาก	50	50
แอนติบอดี	50	50
ปัสสาวะคนปกติ (ไม่มีมอร์ฟีน)	100	-

อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำมาเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 200 ไมโครลิตร เขย่าแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พอครบเวลานำมาเทส่วนใสออก นำทั้งส่วนใส (free form) และตะกอน (bound form) ไปวัดกัมมันตภาพรังสี โดยใช้เครื่อง Automatic Gamma Counter นำค่าร้อยละของการรวมตัวและความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาสร้างกราฟ

3.11.2 ศึกษากราฟมาตรฐานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 0.01 โมลาร์ pH 7.4

เตรียมสารละลายมาตรฐานของมอร์ฟีน ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 0.01 โมลาร์ pH 7.4 แล้วทำการทดลองเหมือนข้อ 3.11.1

3.11.3 ศึกษาอิทธิพลของกำลังแรงอิออน (Ionic strength) ต่อกราฟมาตราฐาน

สร้างกราฟมาตราฐานโดยละลายมอร์ฟีน ความเข้มข้น 0.4 นาโนกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 โมลาร์ แล้วทำการทดลองเหมือนข้อ 3.11.1

3.11.4 ศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อกราฟมาตราฐาน

สร้างกราฟมาตราฐานโดยเตรียมสารละลายมอร์ฟีน 0-4 นาโนกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH ต่าง ๆ กัน คือ 6, 6.5 7, 7.7, 7.9 และ 8.35 แล้วทำการทดลองเหมือนข้อ 3.11.1

3.11.5 การวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู

วัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูทดลอง โดยใส่สารต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารต่าง ๆ ที่ใช้วัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู

สารละลาย	หลอดทดลอง	
	สารตัวอย่าง(µl)	สารมาตราฐาน(µl)
มอร์ฟีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 0.5 โมลาร์ pH 7.4 (0-4 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง)	-	50
สารสกัดจากสมองหนูปกติ	-	50
มอร์ฟีนสกัดจากสมองหนูตัวอย่าง	50	-
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 0.5 โมลาร์ pH 7.4	50	-
มอร์ฟีนติดฉลาก	50	50
แอนติบอดี	50	50

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วอินคิวเบทที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 19 ชั่วโมง พอครบเวลา นำมาเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่า นำไปปั่นด้วย ความเร็ว 2,500 x g อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แยกส่วนใสใส่อีกหลอดหนึ่ง นำทั้งตะกอน (bound form) และส่วนใส (free form) ไปนับกัมมันตภาพรังสี ด้วยเครื่อง Automatic Gamma Counter คำนวณร้อยละของการรวมตัว (% bound) ได้จาก

$$\frac{\text{ค่ากัมมันตรังสีที่นับได้ในตะกอน}}{\text{ค่ากัมมันตรังสีที่นับได้ในตะกอนและส่วนใส}} \times 100$$

นำไปเขียนกราฟมาตราฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรวมตัวกับปริมาณมอร์ฟีน นำค่าร้อยละของการรวมตัวของสารตัวอย่างไปอ่านค่าปริมาณมอรีฟีนจากกราฟมาตราฐาน

3.11.6 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู

3.11.6.1 ความไว (Sensitivity)

ความไวในการวัดของกราฟมาตราฐาน หมายถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน เมื่อใช้ค่าความเบี่ยงเบนมาตราฐาน ที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตราฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

วิธีหาความไวของวิธีวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู ทำการทดลองโดยใช้สารละลาย ซึ่งประกอบด้วย

ก. มอร์ฟีน 0 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง ใน 0.01 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 50 ไมโครลิตร

ข. สารละลายซึ่งสกัดจากสมองหนูปกติ 50 ไมโครลิตร

ค. มอร์ฟีนติดฉลาก 50 ไมโครลิตร

ง. แอนติบอดี 50 ไมโครลิตร

แล้วทำการทดลองตามวิธี ข้อ **3.11.5** คำนวณหาค่า Mean $\pm$ 2 S.D. ของค่าร้อยละของการรวมตัว ของมอร์ฟีนที่ความเข้มข้นเท่ากับศูนย์จากผลการทดลองทำซ้ำ 10 ครั้ง จากการใช้ T test (N=10) ของเปอร์เซนต์ bound ที่ความเข้มข้น 0 กับ 0.125 นาโนกรัม/หลอดทดลอง ได้ significant different ดังนั้นถือว่า 0.125 นาโนกรัม/หลอดทดลอง เป็น sensitivity

3.11.6.2 <u>ความแม่นยำ</u> (Precision)

การศึกษาความแม่นยำในการวัดทำได้ 2 วิธี คือ

ก. เปรียบเทียบปริมาณมอร์ฟีนในสารตัวอย่างเดียวกัน เมื่อทำการวัดหลาย ๆ ครั้ง พร้อม ๆ กัน (within assay)

ข. เปรียบเทียบปริมาณมอร์ฟีนในสารตัวอย่าง เมื่อทำการทดลองหลาย ๆ ครั้ง ในเวลาต่าง ๆ กัน และแต่ละครั้งทำหลาย ๆ ตัวอย่าง (between assay)

ค่าความแม่นยำได้จากค่า สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of Variation C.V.) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $C.V. = \frac{S.D. \times 100}{\bar{X}}$

3.11.6.3 <u>ความถูกต้อง</u> (Accuracy)

ทำการทดลองโดยเติมสารละลายมอร์ฟีนมาตราฐานลงไปในสารละลายตัวอย่าง โดยเติมปริมาณมอร์ฟีน 4 ระดับ คือ 0.25, 0.50, 1.0 และ 2.0 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง จากนั้นนำไปวัดปริมาณมอร์ฟีนตามวิธี 3.11.5 และคำนวณหา % recovery ดังนี้

สมมุติเติมมอร์ฟีนมาตราฐาน 10 นาโนกรัม / มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายตัวอย่าง เมื่อวัดปริมาณมอร์ฟีนและอ่านค่าของมอร์ฟีนจากกราฟมาตราฐาน คำนวณความเข้มข้นของมอร์ฟีนเพิ่มขึ้น เท่ากับ X นาโนกรัม / มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของมอร์ฟีน 10 นาโนกรัม / มิลลิลิตร วัดได้ X นาโนกรัม / มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของมอร์ฟีน100 นาโนกรัม / มิลลิลิตร วัดได้ $\frac{X \times 100}{10}$ นาโนกรัม / มิลลิลิตร

ในการทดลองนี้จะดู % recovery ได้พร้อมกับ % Accuracy

3.12 การวิเคราะห์หาปริมาณเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนู

3.12.1 การเตรียมรีเซพเตอร์โปรตีน (Kwen-Jen Chang and Pedro Cutrecase8,1979)

ใช้หนูปกติอายุ 3-4 เดือน น้ำหนักประมาณ 250 ถึง 300 กรัม ฆ่าโดยการตัดคอ นำส่วนสมองทั้งหมด ยกเว้น Cerebellum มาบดด้วยโฮโมจีไนเซอร์ ชนิดใช้มือ (โดยชักลูกสูบขึ้นลง 40 ครั้ง) ในสารละลายซูโครส 0.32 โมลาร์ อัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำสมองที่บดแล้วไปปั่นที่ 6,000 g 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนเก็บไว้ ส่วนตะกอนนำไปเติม 0.32 โมลาร์ ซูโครส และบดด้วยโฮโมจีไนเซอร์ แล้วปั่นอีกครั้งหนึ่ง นำสารละลายส่วนบนทั้งหมดมารวมกัน แล้วปั่นที่ 40,000xg 30 นาที นำตะกอนมาละลายด้วย 0.05 โมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักสมอง ตั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาบดอีกครั้ง แล้วนำไปปั่นที่ 6,000xg นาน 15 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนมาปั่นที่ 40,000 x g30 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 โดยใช้ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักสมอง แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

3.12.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนู

การวัดปริมาณเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนูทำได้ โดยอินคิวเบทสารต่าง ๆ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 ซึ่งประกอบด้วยรีเซพเตอร์โปรตีน 2.5 มิลลิกรัม, สารละลายตัวอย่าง 0.1มิลลิลิตร, เบซิทราซิน 118.8 ไมโครกรัม ปริมาตรรวมทั้งหมด 1.9 มิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม ^{3}H-เมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน 0.67 นาโนโมลาร์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ เขย่าให้เข้ากัน อินคิวเบทต่อไปอีกนาน 25 นาที นำมากรองผ่านกระดาษกรองชนิด glass fiber filter (GFB) โดยใช้เครื่องปั๊มแบบดูดอากาศล้างด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 ที่เย็น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองใส่ในขวดสำหรับวัดกัมมันตภาพรังสี นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ทิ้งไว้อีก 30 นาที เติม Toluene Base Scintillation fluid 10 มิลลิเมตร ทิ้งค้างคืน เขย่า แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่อง Packard Liquid Scintillation Counter

ในการวิเคราะห์หาปริมาณเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลินทุกครั้ง ต้องสร้างกราฟมาตราฐาน ซึ่งประกอบด้วย เมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน ปริมาณต่าง ๆ คือ 5, 10, 15, 20, และ 30 พิโคโมลต่อหลอดทดลอง ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

กราฟมาตราฐานสำหรับวัดปริมาณเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน ได้จากการพล้อตกราฟระหว่างค่า $\frac{C_o}{C_x}$ กับปริมาณเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลินมาตราฐานโดยกำหนดให้

$$\text{ค่า } \frac{C_o}{C_x} = \frac{\text{stereospecific binding เมื่อไม่มีเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน}}{\text{stereospecific binding เมื่อมีเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลิน}}$$

Stereospecific binding = ค่า Total binding-nonspecific binding

Nonspecific binding คือ ค่าการนับกัมมันตภาพรังสี (count per minute) เมื่อมีสารละลายมอร์ฟีน ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ 0.1 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง

Total binding คือ ค่าการนับกัมมันตรังสี (count per minute) เมื่อมีหรือไม่มีสารละลายตัวอย่าง

3.13 <u>วิธีวิเคราะห์หา ระดับ รีเซพเตอร์ของเมทไธโอนีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนู</u>

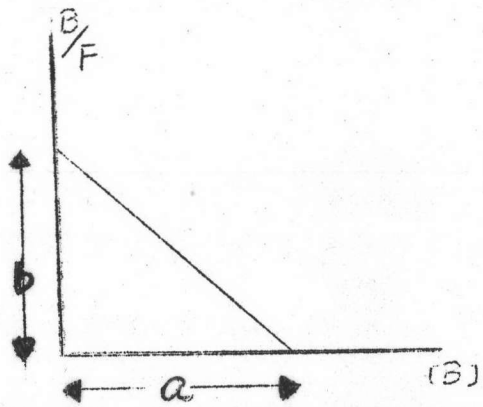
3.13.1 <u>การเตรียมรีเซพเตอร์โปรตีน</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Pert and Snyder 1975)

เตรียมรีเซพเตอร์โปรตีน จากสมองหนูปกติ และหนูติดยามอร์ฟีน โดยฆ่าหนู หลังจากฉีดมอร์ฟีนนาน 40 นาที แล้วนำมาเติม 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 ใช้ปริมาตร 14 เท่าของน้ำหนักสมองและบดด้วยไฮโมจีไนเซอร์ชนิดใช้มือ 40 ครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 18,000 x g นาน 10 นาที ตะกอนที่ได้นำมาเติมบัฟเฟอร์ปริมาตรเท่าเดิม โฮโมจีไนซ์เซอร์และปั่นล้างแบบเดียวกันนี้อีก 4 ครั้ง เพื่อล้างมอร์ฟีนออกให้หมด และทดสอบโดยริธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ นำตะกอนมาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน ประมาณ 2.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ทุกครั้งนำสารละลายที่แช่แข็งนี้มาวางไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ ประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งส่วนที่เป็นน้ำแข็งละลายหมด นำไปปั่นตะกอนที่ได้เติมสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตรเท่าเดิม วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลินต่อไป

3.13.2 การวิเคราะห์หาปริมาณรีเซพเตอร์ของเมทไธโอนีน - เอ็นเคฟาลิน

อินคิวเบทสารต่าง ๆ ต่อไปนี้ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.7 คือ รีเซพเตอร์โปรตีน 2.5 มิลลิกรัม มอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 10^{-5} โมลาร์ เบซิทราซิน 118.8 ไมโครกรัม ปริมาตรทั้งหมด 1.9 มิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม ^{3}H- เมทไธโอนีนเอนเคฟาลิน ความเข้มข้นตามลำดับ คือ 0.067, 0.1675, 0.335, 0.67 และ 0.8375 นาโนโมลาร์ อินคิวเบทต่ออีก 25 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง glass fiber filter (GFB) โดยใช้เครื่องปั๊มแบบดูดอากาศ (vacuum pump) นำกระดาษกรองไปวัดค่ากัมมันภาพรังสีด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.12.2

คำนวณหาระดับรีเซพเตอร์ และค่า dissociation constant (K_d) โดยใช้ Scatchard plot



ระดับรีเซพเตอร์ (n) คือ ค่าที่ได้จากจุดตัดบนแกน X

ค่า dissociation constant (K_d) คือ

$$\frac{\text{ระยะจากจุดเริ่มต้นจนถึงจุดตัดบนแกน X (a)}}{\text{ระยะจากจุดเริ่มต้นจนถึงจุดตัดบนแกน Y (b)}}$$