

ความสัมพันธ์ระหว่างองศาการค้ำยามอร์ฟีนและ
รีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน ในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนู



นางสาว วัฒนา ไชยศิริพุ่มศิริ

007449

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2525

ISBN 974-561-402-5

117262276

A Correlation between Degree of Morphine Tolerance and
Enkephalin Receptor in the Portions of Rat Brain

Miss Watana Chaisiripoomkere

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1982

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างองค์การคือยามอร์ฟีนและรีเซพเตอร์ของ
เอ็นเคฟาลิน ในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนู
โดย นางสาว วัฒนา ไชยศิริพุ่มศิริ
ภาควิชา ชิวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันต์ พณิชยกุล



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทวีพยไธชก)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันต์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปรีดา ชัยศิริ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างองค์การคือยามอร์ฟิน และรีเซพเตอร์
 ของเอ็นเคฟาลิน ในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนู
 ชื่อนิสิต นางสาว วัฒนา ไชยศิริพุ่มศิริ
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมพันธ์ พณิชยกุล
 ภาควิชา ชีวเคมี
 ปีการศึกษา 2524



บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษากลไกการคือยามอร์ฟินของหนู โดยการใช่วิธีของ เสาวนิยม กัญจนชุมพล (1979) สามารถพัฒนาให้หนูคือยามอร์ฟินมีค่าองค์การคือยา ซึ่งวัดด้วยค่า Median Analgetic Dose (AD₅₀) เริ่มตั้งแต่ 5, 9.8, 17, 32.5, 112 และ 300 มิลลิกรัมมอร์ฟิน/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อให้หนูเหล่านี้ซึ่งคเลขมอร์ฟิน จะมีการลดน้ำหนักตัวเฉลี่ย 3.4, 5.9, 6.8, 8.6 และ 12.7 เปอร์เซ็นต์เทียบกับน้ำหนักก่อนทดสอบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยากับค่าองค์การคือยา เมื่อวัดระดับมอร์ฟินในสมองโดยวิธีราดิโออิมมูโนแอสเสย์ สมองส่วน Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla และ Cerebellum ของหนูคือยาแบบเรื้อรังและเฉียบพลัน มีระดับมอร์ฟินเพิ่มขึ้น เป็นสัดส่วน โดยตรงกับค่าองค์การคือยาที่เพิ่มขึ้น และการกระจายของมอร์ฟินในสมองแต่ละส่วนจะมีค่าไม่เท่ากัน สมองส่วน Cerebellum จะมีระดับมอร์ฟินวัดได้สูงที่สุด

สำหรับหนูคือยาต่อความเข้มข้นของมอร์ฟิน 32.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีการเพิ่มระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลินในสมองส่วน Pon & Medulla และ Cortex เมื่อเทียบกับสมองหนูปกติ

ค่า dissociation constant (K_d) ของการจับกันระหว่าง เมทไฮโอนีนเอ็นเคฟาลินกับรีเซพเตอร์ ในสมองหนู จะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในสมองหนูส่วน Thalamus & Hypothalamus และ Mid brain ของหนูคือยาเรื้อรังต่อความเข้มข้นของมอร์ฟิน 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

9.

Thesis Title A Correlation between Degree of Morphine
Tolerance and Enkephalin Receptor in the
Portions of Rat Brain.

Name Miss Watana Chaisiripoomkere

Thesis Advisor Assistant Professor Sanha Panichajakul

Department Biochemistry

Academic Year 1981

Abstract

The aim of this research project is to study the mechanism of morphine tolerance in rat. By the application of the method which was developed by Saowanee Karnjanachumpol (1979), it was possible to develop the morphine tolerance in rats as measured by the value of "median analgetic dose" (AD₅₀) from 5, 9.8, 17, 32.5, 112 and 300 mg./kg. body weight.

The mean loss of body weight due to the abrupt withdrawal of morphine corresponding to the degree of tolerance is found to be 3.4, 5.9, 6.8, 8.6 and 12.7 percents respectively.

The level of morphine obtained by the radioimmunoassay method in the brain portion; Cortex, Thalamus & Hypothalamus, Mid brain, Pon & Medulla and Cerebellum is increased in linear proportion to the degree of tolerance.

The distribution of morphine in each portion of rat brain is distinctly difference and found to be highest in cerebellum. The level of enkephalin receptor is significantly increased in the portion; Pon & Medulla and Cortex of the rat brain which are addicted to morphine degree of tolerance 32.5 and 300 mg./kg. body wt.

The results also indicate the remarkably decrease of the dissociation constant of binding (K_d) between methionine enkephalin and opiate receptor in the portion; Thalamus & Hypothalamus and Mid brain of the rat addicted to morphine at the above degree of tolerance.



ช.

กิติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ และขอขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณา
ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันต์ พณิชยกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรร เสริญ ทรัพย์โตษก
อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ
รองศาสตราจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ
รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรพรณ ดำนฤตรา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์
คุณ สุเชษฐ์ ชัยเจริญ
คุณ ไพพรรณ พิทยานนท์
คุณ สุพร นุชดำรงค์
คุณ นฤมล เรืองฤทธิอินนท์
คุณ กิ่งแก้ว วัฒนาเดชาพร

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ดิถกนวมินทรราชินี โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
ภาควิชาโลหิตวิทยา ดิถกนวมินทรราช คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทคัดย่อภาษาไทย	ง.
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ.
กิตติกรรมประกาศ	ช.
รายการตารางประกอบ	ญ.
รายการรูปประกอบ	ฉ.
บทที่	
1. บทนำ	
2. เคมีภัณฑ์ วัสดุภัณฑ์ และ เครื่องมือ	1
2.1 เคมีภัณฑ์	15
2.2 วัสดุภัณฑ์	16
2.3 เครื่องมือ	16
3. วิธีการวิจัย	18
3.1 การเตรียมสารละลาย	18
3.2 การเลี้ยงและระวังรักษาหนูทดลอง	21
3.3 การให้มอร์ฟินและ 0.85% โซเดียมคลอไรด์	21
3.4 วิธีทดสอบการระงับปวด (analgesic response) ของหนู	21
3.5 วิธีหาค่า Median Analgetic Dose (AD ₅₀)	21
3.6 การพัฒนาการคื้อยามอร์ฟินในหนู	22
3.7 การศึกษาภาวะพึงยาทางกายของหนูติดมอร์ฟินแบบเรื้อรัง ด้วยค่าองศาการคื้อยาต่าง ๆ	22
3.8 การเตรียมสัตว์ทดลองสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟินและ เอ็นเคฟาลินในสมองหนู	23
3.9 การวัดปริมาณโปรตีน	25
3.10 วิธีสกัดมอร์ฟินและ เอ็นเคฟาลินจากสมองหนู	25
3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟินในสมองหนูทดลองโดย วิธีราดิโออิมมูโนแอสเสย์	26
3.12 การวิเคราะห์หาปริมาณเมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลินในสมองหนู	30
3.13 วิธีวิเคราะห์หาระดับ รีเซพเตอร์ของเมทาไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ในสมองหนู	31

4. ผลการวิจัย	
4.1 ผลการทดสอบการระงับปวดในหนูทดลอง	33
4.2 ผลการพัฒนาการคดียามอร์ฟินของหนูอย่างมีระบบด้วยค่า AD ₅₀ . . .	33
4.3 ผลการศึกษาภาวะพึงยาทางกายในหนูคดียามอร์ฟิน	37
4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟิน โดยวิธีราดิโออิมมูโนแอสเสย์ . .	37
4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน ในสมองหนู . .	62
4.6 การวิเคราะห์หาระดับรีเซพเตอร์ของเมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน และค่า dissociation constant ของการจับระหว่าง ³ H-เมทไอโอนีนเอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์โปรตีนในสมองหนู . .	70
5. วิจารณ์และสรุป	84
เอกสารอ้างอิง	98
ประวัติผู้เขียน	106

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในการหาปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะ โดยวิธีราตีโออิมมิวโนแอสเสย์	26
2. ส่วนประกอบของสารต่าง ๆ ที่ใช้วัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู	28
3. ตัวอย่างแสดงถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาค่า AD ₅₀ 9.8 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักตัว	34
4. แสดงความแม่นยำของการวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู ด้วยวิธีราตีโออิมมิวโน- แอสเสย์	48
5. แสดงความถูกต้องของการหาปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนูด้วยวิธีราตีโออิมมิวโน- แอสเสย์	48
6. น้ำหนักของแต่ละส่วนของสมองหนูปกติ และหนูติดยามอร์ฟีนแบบเรื้อรังด้วยค่า องศาการดี้อยา (AD ₅₀) ต่าง ๆ กัน	50
7. แสดงระดับมอร์ฟีนในแต่ละส่วนของสมองหนู ซึ่งได้รับมอร์ฟีนแบบเรื้อรัง ด้วยค่าองศาการดี้อยา (AD ₅₀) ต่าง ๆ กัน	51
8. แสดงระดับมอร์ฟีนในแต่ละส่วนของสมองหนู ซึ่งได้รับมอร์ฟีนแบบเฉียบพลัน ด้วยค่าองศาการดี้อยา (AD ₅₀) ต่าง ๆ กัน	52
9. ระดับเอ็นเคฟาลิน ในแต่ละส่วนของสมองหนูปกติ	73
10. แสดงระดับรีเซพเตอร์ของเอ็นเคฟาลิน ในแต่ละส่วนของสมองหนูปกติและหนู ติดมอร์ฟีนแบบเรื้อรังด้วยค่าองศาการดี้อยา (AD ₅₀) 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	78
11. แสดงค่า dissociation constant ของการจับกันระหว่างเมทไฮโอนีน เอ็นเคฟาลิน กับรีเซพเตอร์ ในแต่ละส่วนของสมองหนูปกติ และหนูติดมอร์ฟีน แบบเรื้อรังด้วยค่าองศาการดี้อยา (AD ₅₀) 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักตัว	79

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1. Phenanthrene และ Benzyloisoquinoline Alkaloid ซึ่งพบในฝิ่น	2
2. อนุพันธ์ต่าง ๆ ของฝิ่น	3
3. สูตรโครงสร้างของเมทไฮโอนีนเอ็นเคฟาลิน	8
4. ก. ภาพถ่ายสมองหนู	24
ข. ภาพถ่ายแสดงส่วนต่าง ๆ ของสมองหนู (rat) 5 ส่วน ซึ่งใช้วัดระดับมอร์ฟีน	24
5. แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง probit กับ log ความเข้มข้นมอร์ฟีนที่ใช้ในการหาค่า AD ₅₀	34
6. แสดงความเข้มข้นของมอร์ฟีน และจำนวนวันที่มีคุดในหนูทดลอง	35
7. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ามอร์ฟีน AD ₅₀ กับวันที่เริ่มการฉีดยาบนกระดาษกราฟ semi-log	36
8. แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักหนู ในระหว่างพัฒนาการคือยาในแต่ละความเข้มข้นของมอร์ฟีน 5, 9.8, 17, 32.5 และ 112 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	38-39
9. แสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักลดของหนูที่ดื่ยมอร์ฟีนแบบเรื้อรัง หลังจากงดเสพมอร์ฟีนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	40
10. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์น้ำหนักลดกับองศาการคือยาหลังจากหยุดเสพมอร์ฟีน	41
11. กราฟมาตรฐานที่ใช้วัดปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยวิธี RIA	42
12. อิทธิพลของ Ionic Strength ที่มีต่อกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู โดยวิธี RIA	43
13. อิทธิพลของ pH ที่มีต่อกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู โดยวิธี RIA	45
14. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวัดปริมาณมอร์ฟีนในสมองหนู โดยวิธี RIA	46
15. ผลของการเจือจางมอร์ฟีนที่สกัดจากสมองหนูให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กันด้วยสารละลายที่สกัดจากสมองหนูปกติ	47
16. แสดงระดับมอร์ฟีนในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนูที่ติดมอร์ฟีนแบบเรื้อรังที่ AD ₅₀ ต่าง ๆ	53
17. แสดงระดับมอร์ฟีนในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนูที่ได้รับมอร์ฟีนแบบเฉียบพลันที่ AD ₅₀ ต่าง ๆ	54

18.	เปรียบเทียบระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Cortex ของหนูตัดยาแบบเรื้อรัง และเจียบพลันที่ AD ₅₀ ต่าง ๆ หลังจากฉีดมอร์ฟินนาน 40 นาที	55
19.	แสดงระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Thalamus และ Hypothalamus ของหนูตัดยาแบบเรื้อรังและเจียบพลันที่ AD ₅₀ ต่าง ๆ หลังจากฉีดมอร์ฟินนาน 40 นาที	56
20.	แสดงระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Mid brain ของหนูตัดยาแบบเรื้อรังและเจียบพลันที่ AD ₅₀ ต่าง ๆ หลังจากฉีดมอร์ฟินนาน 40 นาที	57
21.	แสดงระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Pon & Medulla ของหนูตัดยาแบบเรื้อรังและเจียบพลันที่ AD ₅₀ ต่าง ๆ หลังจากฉีดมอร์ฟินนาน 40 นาที	58
22.	แสดงระดับมอร์ฟินในสมองส่วน Cerebellum ของหนูตัดยาแบบเรื้อรังและเจียบพลันที่ AD ₅₀ ต่าง ๆ หลังจากฉีดมอร์ฟินนาน 40 นาที	59
23.	แสดงความสัมพันธ์ของระดับมอร์ฟิน กับค่าองศาการดื้อยาในสมองส่วน Thalamus และ Hypothalamus ของหนูตัดยาแบบเรื้อรัง	60
24.	แสดงความสัมพันธ์ของระดับมอร์ฟิน กับความเข้มข้นของมอร์ฟิน ที่ได้รับในสมองส่วน Thalamus & Hypothalamus ของหนูตัดยาแบบเจียบพลัน	61
25.	ความเข้มข้นของโปรตีนที่มีผลต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³ H) met-enkephalin กับ receptor protein	63
26.	ผลของเวลาที่ใช้ในการ assay ต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³ H) met-enkephalin กับ receptor protein	64
27.	แสดงความเข้มข้นของมอร์ฟินที่มีผลกระทบต่อการจับกันระหว่าง (³ H) methionine enkephalin กับ receptor protein	66
28.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ (³ H) met-enkephalin กับความสามารถของ (³ H) met-enkephalin ในการจับกับ receptor protein	67
29.	ผลของ pH ของสารละลาย Tris-HCl buffer ต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³ H) met-enkephalin กับ receptor protein	68
30.	ผลของความเข้มข้นของ Bacitracin ต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³ H) met-enkephalin กับ receptor protein	69
31.	ผลกระทบของ met-enkephalin ต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง (³ H) met-enkephalin กับ receptor protein	71
32.	กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณ met-enkephalin	72
33.ก,ข	แสดงวิธีหาค่า receptor site ของเอ็นเคฟาลิน และค่า K _d ของการจับระหว่าง (³ H) met-enkephalin กับ receptor protein ในสมองส่วน Cortex และ Thalamus & Hypothalamus	75

รูปที่	หน้า
33. ค,ง,จ แสดงวิธีหาค่า receptor site ของเอ็นเคฟาลิน และค่า K_d ของการจับระหว่าง (3H) met-enkephalin กับ receptor protein ในสมองส่วน Mid brain Pon & Medulla และ Cerebellum . .	76
34. แสดงระดับเมทไธโอนีน เอ็นเคฟาลินในส่วนต่าง ๆ ของหนูปกติ	81
35. แสดงระดับรีเซพเตอร์ในส่วนต่าง ๆ ของสมองหนูปกติ และหนูติดมอร์ฟีน แบบเรื้อรัง ด้วยองศาการดื้อยา 32.5 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	82
36. คราฟมาตราฐานในการวัดปริมาณโปรตีน โดย Lowry method	83
37. กลไกการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวดของหนู	91
38. Model แสดงกลไกของการดื้อยามอร์ฟีน ซึ่งสัมพันธ์กับเอ็นเคฟาลิน และ รีเซพเตอร์ฝิ่น (Snyder, 1977)	94