อัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์ฟีนจากระบบประสาทส่วนกลาง และเนื้อเยื่ออื่น ๆ (การศึกษาเบื้องต้น)*

วิไล โรจน์วิโรจน์**
ราตรี วงศ์ดอกไม้***
จิตร สิทธิอมร****

The studies of the rate of disappearance of molecules of morphine from the central nervous system and other organs were carried out in 10 rats. One hundred and twenty five μci of radioactive morphine was injected into the tail vein of the rat. After a period of survival time ranging from one hour to seventeen days, each animal was perfused with neutral formalin under pressure. Brain, spinal cord, spleen, liver, kidney and heart were removed and fixed. Serial frozen sections of 25 micra in thickness were obtained Autoradiographic technique was performed on these sections. The silver grains, indication of binding sites of morphine, were found in many areas of the brain. More abundant grains were found in the regions of amygdala, paraventricular area and periaqueductal gray. They were also found in the spleen, liver, kidney and cardiac muscle. In the brain, the rate of appearance of molecule of morphine could be divided into 3 phases. In the first phase, 1-3 hours, there were an increase in grains in amygdala and paraventricular areas,

* ได้รับการสนับสนุนจาก เงินทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ปีการศึกษา 2521

** ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*** ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
**** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

and a decrease in the periaqueductal gray. The second phase, 3–16 hours, the grains in the amygdala and in the paraventricular area were decreased, but no change was observed in the periaqueductal gray. In the third phase, 3–17 days, the grains in these three areas were decreased in the same rate of 0.6 ± 0.1 grain/day/900 μm^2. In other organs, such as spleen, liver and kidney, the grains disappeared very slowly until the seventeenth day in which small amount of grains could be seen. But in the cardiac muscle the amount of grains were still abundant on the seventeenth day.

สารพวกอนุพันธ์ฝิ่น (opium derivatives) มีผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางโดยไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ electrical activities[15] ซึ่งพบว่ามีตัวรับเฉพาะสำหรับสารอนุพันธ์ฝิ่น (opiate receptors) มีลักษณะโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ซึ่งเป็นโปรตีนเป็นส่วนใหญ่และเข้าใจว่าอยู่ที่ผนังของเซลล์ประสาท[5,6,7,8] โดยมีส่วนใหญ่อยู่ที่ synaptic membrane[2,13] Kuhar[1] พบว่าบริเวณ amygdala ของสมองเป็นบริเวณที่มี opiate receptors มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบมากที่บริเวณ periaqueductal grey ของ midbrain, hypothalamus, medial thalamus, head of caudate, precentral gyrus, postcentral gyrus และ occipital pole และพบได้ปริมาณน้อยที่ไขสันหลัง, cerebellum และ white matter จากการศึกษาพบว่า periaqueductal gray เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการรับความรู้สึกเจ็บปวด[7,6] แต่เมื่อฝังมอร์ฟีนเข้าไปที่ amygdala พบว่าไม่สามารถระงับอาการปวดได้[6] เชื่อว่า opiate receptors ที่บริเวณ amygdala น่าจะเกี่ยวข้องกับปฏิกริยาด้านอื่นของอนุพันธ์ฝิ่น ได้แก่การทำให้เกิด euphoria และเกี่ยวข้องกับทางด้านอารมณ์เมื่อเกิดความรู้สึกเจ็บปวดด้วย ถึงแม้จะมีการศึกษาเกี่ยวกับ opiate receptors มากมาย แต่ไม่มีรายงานว่าอนุพันธ์ฝิ่นที่เกาะติดกับ receptors นั้น จะเกาะติดตลอดไปหรือมีการหลุดไปบ้างหรือถูกทำให้เปลี่ยนสภาพไปโดยเซลล์ประสาท คณะผู้วิจัยเห็นว่าการศึกษาในแง่นี้อาจมีประโยชน์เกี่ยวกับการศึกษาการติดยาของผู้ที่ใช้สารพวกฝิ่นหรือมอร์ฟีนอยู่เสมอ อาจเป็นไปได้ที่ว่ามีบาง receptors ในสมองที่ยังมีอนุพันธ์ฝิ่นติดอยู่อย่างถาวร ซึ่งอาจมีผลทำให้ผู้ที่ใช้ยานั้นเกิดการติดยาขึ้นมาได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาถึงอัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์ฟีนจาก

ระบบประสาทส่วนกลางและเนื้อเยื่ออื่น ๆ การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาขั้นต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ได้ทำการทดลองในหนูขาวพันธุ์ Wista ทั้งสองเพศ น้ำหนักประมาณ 120–200 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มเพื่อศึกษาดังนี้

1. ศึกษาอัตราการหายไปจากพลาสม่าของอนุพันธ์ฝีนเพื่อหา optimal survival time วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทิ้งให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่ (optimal survival time) เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการศึกษาขั้นต่อไป ใช้หนู 9 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบอัตราการหายไปจากพลาสม่าของอนุพันธ์ฝีนในสัตว์ทดลองที่เกิดภาวะดื้อยา (tolerance) และในสัตว์ที่ยังไม่เกิดภาวะดื้อยา (nontolerance)

กลุ่มแรกหนูจำนวน 8 ตัว ฉีดสารละลายมอร์ฟีนเข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 6 วัน เพิ่มขนาดของยาทุกวัน โดยวันแรกได้รับ 6 มก. วันที่ 2 ได้ 9 มก. วันที่ 3,4 และ 5 ได้วันละ 12 มก. วันที่ 6 ฉีดสารละลายมอร์ฟีน 4 มก. จากนั้นเจาะเลือด นำไปหาปริมาณของอนุพันธ์ฝีนในระยะเวลาต่าง ๆ กันหลังจากฉีดยาครั้งสุดท้าย การหาปริมาณของอนุพันธ์ฝีนใช้วิธี radioimmunoassay[14]

กลุ่มที่ 2 หนูจำนวน 1 ตัว ฉีดสารละลายมอร์ฟีน 4 มก. ครั้งเดียวเข้าทางช่องท้องเพื่อศึกษาภาวะไม่ดื้อยา (nontolerance) หลังจากนั้นเจาะเลือดในระยะเวลาต่าง ๆ กันเพื่อตรวจหาปริมาณของอนุพันธ์ฝีนโดยวิธีเดียวกับกลุ่มแรก

2. ศึกษาเทคนิคของออโตเรดิโอกราฟและหา optimal exposure time ใช้หนู 1 ตัว ฉีดสารมอร์ฟีนกัมมันตรังสี (radioactive morphine) 125 μci เข้าทางหลอดเลือดดำที่หางหนู ปล่อยให้หนูมีชีวิตอยู่ 1 ชม. หลังจากฉีดยาแล้ว perfuse ด้วย neutral formalin ภายใต้ความดัน เอาสมอง ไขสันหลัง ตับ ไต ม้าม และหัวใจ มาแช่ใน 30% sucrose formalin นาน 1 วัน และ 10% neutral formalin 4 วัน นำเนื้อเยื่อทั้งหมดมาตัด frozen section หนา 25 micra ต่อจากนั้นนำมาศึกษาเทคนิคของออโตเรดิโอกราฟตามขั้นตอนของ Roger[10] ซึ่งมีหลักการกว้าง ๆ คือ dehydration และ rehydration เนื้อเยื่อโดยใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนำไปชุบ emulsion ในห้องมืด เก็บสไลด์ทั้งหมดไว้ในกล่องสีดำไม่ให้ถูกแสงสว่าง โดยทิ้งให้มี

exposure time ต่าง ๆ กันคือ 4 สัปดาห์, 6 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาล้าง (develop) ในน้ำยา developer แล้วนำเนื้อเยื่อทั้งหมดไปย้อมสีด้วย cresyl violet

3. ศึกษาอัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์พีนออกจากระบบประสาทส่วนกลางและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ทำการทดลองในหนู 10 ตัว ฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสีตัวละ 125 μci เข้าทางเส้นเลือดที่หางหนูและทิ้งให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน (survival time) ดังนี้คือ 1 ชม., 3 ชม., 6 ชม., 16 ชม., 24 ชม., 3 วัน, 6 วัน, 10 วัน, 12 วันและ 17 วัน ตามลำดับ การกำหนด survival time อาศัยปริมาณอนุพันธ์ฝีนในพลาสม่าจากการศึกษาในตอนที่ 1 เป็นเกณฑ์ เตรียมเนื้อเยื่อโดยวิธีเดียวกับข้อ 2 แต่ให้มี exposure time 6 สัปดาห์และ 8 สัปดาห์ เนื่องจากผลการทดลองในตอนที่ 2 พบว่า ถ้า exposure time 4 สัปดาห์ จะไม่มี grains ของโมเลกุลของมอร์พีน develop เลย

ผล

1. ศึกษาอัตราการหายไปจากพลาสม่าของอนุพันธ์ฝีน

กลุ่มแรก ทำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะดื้อยา โดยให้สารละลายมอร์พีนเข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 5 วัน แล้วเจาะเลือดนำไปหาปริมาณของอนุพันธ์ฝีนในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบปริมาณของอนุพันธ์ฝีนในพลาสม่าสูงสุดใน 1 ชม. แรกหลังจากฉีดยาครั้งสุดท้าย ปริมาณที่พบนี้ลดลงไปเรื่อย ๆ และหายไปหลังจากวันที่ 17 (รูปที่ 1) ใน 24 ชม.แรกหลังจากฉีดยาพบมีอัตราการหายไปจากพลาสม่าของอนุพันธ์ฝีนเป็น 2 ระยะ คือระยะ 4 ช.ม. แรกจะลดลงเร็วมาก หลังจากนั้นจะลดลงช้า ๆ

กลุ่มที่สอง ฉีดสารละลายมอร์พีนครั้งเดียว เพื่อดูอัตราการหายไปของอนุพันธ์ฝีนจากพลาสม่าในหนูที่ไม่ได้ดื้อยา ปรากฏว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแรกที่เกิดภาวะดื้อยาแล้วไม่มีความแตกต่างกันในอัตราการหายไป คือ 4 ช.ม. แรกจะลดลงเร็วมาก หลังจากนั้นจะลดลงช้า ๆ (รูปที่ 2) แล้วจะค่อย ๆ หายไปหมดหลังจาก 15 วัน

จากการศึกษาในเบื้องต้นนี้ ทำให้ได้แนวทางของการกำหนด survival time ของสัตว์ทดลองในการศึกษาขั้นต่อไป

2. ศึกษาเทคนิคของออโตเรดิโอกราฟและหา optimal exposure time

จากการศึกษาในหนู 1 ตัว ฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสี 125 μci และทิ้งให้สัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่ 1 ชม. เตรียมสไลด์ให้มี exposure time 4 สัปดาห์, 6 สัปดาห์ และ 8

สัปดาห์ พบว่าในสไลด์ชุดที่ 1 ที่ทิ้งไว้ให้มี exposure time 4 สัปดาห์นั้นไม่พบมี grains ของโมเลกุลของมอร์พีนปรากฏในเนื้อเยื่อทั้งหมดที่เตรียม แต่ในชุดที่ 2 และที่ 3 ที่ทิ้งไว้ 6 สัปดาห์และ 8 สัปดาห์นั้นพบมี grains ของโมเลกุลของมอร์พีนปรากฏอยู่ในสมองและเนื้อเยื่ออื่น ๆ

บริเวณต่าง ๆ ในสมองที่พบ grains ของโมเลกุลของมอร์พีน มีดังนี้

2.1 Cerebral cortex พบที่ dorsal area, pyriform cortex และ entorhinal cortex

2.2 Telencephalic nuclei พบที่ caudate nuclei, globus pallidus และ amygdaloid nuclei

2.3 Diencephalon พบที่ pretectal nuclei, centromedian thalamic nuclei, mammillary body และ hypothalamus

2.4 Midbrain พบที่ substantia nigra, interpeduncular nuclei และ periaqueductal gray

2.5 Pons พบกระจายทั่วไปใน tegmentum ของ pons และบริเวณ medial longitudinal fasciculus

2.6 Medulla พบที่ locus ceruleus, inferior olivary nuclei และ reticular formation

2.7 Cerebellum พบที่ medial cerebellar nuclei

2.8 ไขสันหลัง พบกระจายทั่วไปในบริเวณ dorsal horn, dorsal column และพบเล็กน้อยที่ ventral horn

ในบริเวณของสมองเหล่านี้ พบว่าบริเวณที่มี grains ของโมเลกุลของมอร์พีนหนาแน่นกว่าบริเวณอื่นได้แก่ amygdala (รูปที่ 3), paraventricular area (รูปที่ 4) และ periaqueductal gray (รูปที่ 5)

ในเนื้อเยื่ออื่น เช่น ตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่ามี grains ของโมเลกุลของมอร์พีนกระจายอยู่ทั่วไป แต่ไม่มากนัก

3. ศึกษาอัตราการหายไปของโมเลกุลของมอร์พีนจากระบบประสาทส่วนกลางและเนื้อเยื่ออื่น ๆ

จากการทดลองในหนู 10 ตัว ฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสี แล้วทิ้งให้มี survival time ต่างๆ กัน เตรียมสไลด์โดยให้มี exposure time 6 สัปดาห์และ 8 สัปดาห์ ได้ผลดังนี้

3.1 อัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์พีนจากระบบประสาทส่วนกลาง พบว่าปริมาณของ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนภายใน 2 วันหลังจาก

ฉีด ต่อจากนั้นจะลดลงช้า ๆ คณะผู้วิจัยได้นับปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนในสมอง 3 บริเวณด้วยกันคือ amygdala, paraventricular area และ periaqueductal gray เนื่องจากบริเวณเหล่านี้มีปริมาณ grains หนาแน่นกว่าบริเวณอื่น แต่การกระจายตัวของ grains ไม่ค่อยสม่ำเสมอ จึงแบ่งแต่ละบริเวณออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่มี grains หนาแน่นน้อย ปานกลางและมาก และนับ grains ต่อพื้นที่หน้าตัด 900 μm^2 โดยใช้ ocular grid ช่วย แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยในบริเวณต่าง ๆ นำค่าเฉลี่ยของ grains แต่ละบริเวณมาเขียนกราฟกับเวลา (รูปที่ 6, 7 และ 8) พบว่าอัตราการหายไปของ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนอาจแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะแรก 1–3 ช.ม. หลังจากฉีดสารละลายมอร์พีนกัมมันตรังสี พบว่าอัตราการเพิ่มของ grains บริเวณ amygdala = + 12.75 บริเวณ paraventricular = + 5.3 และบริเวณ periaqueductal gray = – 4.75 แสดงว่าในระยะนี้ที่บริเวณ amygdala และ paraventricular จะมีอัตราการเพิ่มของ grains 12.5 และ 5.6 grains/ชั่วโมง/900 μm^2 ตามลำดับ แต่ที่ periaqueductal gray มีอัตราการลดลงของ grains 4.75 grains/ชั่วโมง/900 μm^2

ระยะที่สอง 3–16 ช.ม. หลังจากฉีดสารละลายมอร์พีนกัมมันตรังสี พบว่าบริเวณ amygdala และ paraventricular มีปริมาณ grains ลดลงด้วยอัตรา 2.4 และ 1.3 grains/ชั่วโมง/900 μm^2 ตามลำดับ แต่ที่ periaqueductal gray ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ระยะที่สาม 3–17 วันหลังจากฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสี พบอัตราการลดของ grains บริเวณ amygdala, paraventricular nuclei และ periaqueductal gray = – 0.7, –0.5 และ –0.6 ตามลำดับ แสดงว่ามีปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนลดลงหมดทั้ง 3 บริเวณ ในอัตรา 0.6 ± 0.1 grains/วัน/900 μm^2

3.2 อัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์พีนจากเนื้อเยื่ออื่น ๆ จากการดูอัตราการหายไปของ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ ตับ ไต ม้ามและหัวใจ พบว่ามี grains ปรากฏอยู่จนถึงวันที่ 17 ในวันที่ 17 ปริมาณ grains ในตับ ไต และม้ามลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ในกล้ามเนื้อหัวใจยังคงมี grains ปรากฏอยู่มากในวันที่ 17 แต่หลังจากนี้ไม่ได้ทำการศึกษา

วิจารณ์

1. ศึกษาอัตราการหายไปจากพลาสม่าของอนุพันธ์ฝิ่น Spector[14] พบว่า ถ้าฉีด

มอร์พีน 5 มก./กก. เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูครั้งเดียว จะพบปริมาณมอร์พีนในพลาสม่าหลังจากฉีดเป็น biphasic delay curve คือใน 4 ช.ม.แรกหลังจากฉีดจะมี biological half life ประมาณ 50 นาที และในช่วงที่ 2 พบมี biological half life ประมาณ 68 ช.ม. ซึ่งตรงกันกับผลที่คณะผู้วิจัยรายงานนี้ คืออัตราการหายไปจากพลาสม่าจะเป็น 2 ระยะ คือ 4 ช.ม. แรกจะลดลงเร็วมาก และหลังจากนั้นจะลดลงช้า ๆ จนถึงวันที่ 17 พบว่าไม่มีมอร์พีนในพลาสม่าเลย (รูปที่ 1 และรูปที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มดื้อยา (tolerance) และกลุ่มไม่ดื้อยา (nontolerance) ของอัตราการหายไปจากพลาสม่าอนุพันธ์ฝิ่นไม่มีความแตกต่างกัน มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการกระจายตัวของมอร์พีนในสัตว์ทดลองหลายชนิด เช่น ลิง,[8] สุนัข[4] และกระต่าย[11] ในการศึกษาปริมาณของมอร์พีนในสมองและในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เพื่อดูความแตกต่างระหว่างกลุ่มดื้อยาและกลุ่มไม่ดื้อยา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเริ่มทำการวิจัย คณะผู้วิจัยคิดว่าถ้าให้สัตว์ทดลองเกิดการดื้อยาเสียก่อนโดยการฉีดสารละลายมอร์พีน ซึ่งจะได้มีสภาพเหมือนกับในคนเสพติด แล้วจึงฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสี เพื่อศึกษาอัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์พีน แต่คิดว่าอาจจะทำการวิจัยไม่ได้ผลเนื่องจากสารละลายมอร์พีนที่ฉีดไปก่อนนั้นอาจไปมี competitive inhibition คือแย่งที่จับกับ receptor site เมื่อฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสีไปทีหลังเพราะสารมอร์พีนกัมมันตรังสีที่ฉีดไปทีหลังมีปริมาณของมอร์พีนน้อย หรือถ้าจะฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสีไปเพื่อทำให้เกิดการดื้อยาก็ไม่สามารถทำได้ เพราะว่ามีราคาแพงมาก แต่จากการศึกษาอัตราการหายไปจากพลาสม่าของอนุพันธ์ฝิ่นพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มดื้อยาและกลุ่มไม่ดื้อยา จึงได้ทำการศึกษาเฉพาะกลุ่มที่ไม่ดื้อยาอย่างเดียว โดยฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสีครั้งเดียว และศึกษาอัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์พีนจากสมองและเนื้อเยื่ออื่น ๆ เป็นการศึกษาเบื้องต้น

2. ศึกษาเทคนิคของออโตเรดิโอกราฟและหา optimal exposure time วิธีการที่คณะผู้วิจัยทำต่างกับที่ Pert และคณะทำ[8,9,12] คือ คณะผู้วิจัยใช้เนื้อที่ fixed ด้วย formalin ก่อนนำมาตัด section ไม่ได้ใช้เนื้อเยื่อสด (fresh tissue) ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่ามี grains ของโมเลกุลของมอร์พีนปรากฏในบริเวณต่าง ๆ ที่เป็น receptors ของมอร์พีนในสมองเช่นเดียว

กับที่ Pert และคณะทำไว้ แต่ปริมาณของ grains น้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าเวลา perfuse หนูด้วย neutral formalin นั้นอาจจะดันโมเลกุลของมอร์พีนที่เกาะกับ receptors อย่างหลวมๆ หลุดออกไป Grains ที่ปรากฏจึงเป็นโมเลกุลที่เกาะกับ receptors อย่างหนาแน่นเหตุผลที่ผู้วิจัยใช้ fixed tissue คือ

2.1 เนื่องจากเครื่องมือที่มีอยู่ไม่สามารถใช้ตัดเนื้อเยื่อสดได้ คณะผู้วิจัยได้ลองเอาเนื้อเยื่อสดนี้ไปแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อน แล้วจึงนำมาตัด frozen section โดยเครื่องมือที่มีอยู่ แต่ก็ไม่ได้ผลเนื่องจากเนื้อเยื่อไม่แข็งพอที่จะ mount บนสไลด์ได้

2.2 เนื่องจากคณะผู้วิจัยคิดว่า การ fixed เนื้อเยื่อก่อนจะได้ประโยชน์ในแง่ที่ว่า grains ที่ปรากฏเป็นโมเลกุลของมอร์พีนที่เกาะกับ receptors อย่างหนาแน่น น่าจะเป็นส่วนที่มีการแสดงปฏิกริยาทางสรีรวิทยา (physiologic action) จึงได้เลือกวิธีนี้

เทคนิคที่คณะผู้วิจัยทำนั้น ข้อที่ควรระวังคือสไลด์ที่จะ mount เนื้อเยื่อต้องสะอาด มิฉะนั้นจะทำให้การนับ grains ผิดไปจากความเป็นจริงได้ นอกจากนี้ยังต้องระวังอย่าให้สไลด์ถูกแสงสว่างมิฉะนั้นจะอ่านผลไม่ได้เลย สำหรับน้ำยาที่ใช้นั้นสามารถเตรียมขึ้นได้เอง สารที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศคือ NTB_2 emulsion

จากผลของการวิจัยพบว่า optimal exposure time คือ 6–8 สัปดาห์ แต่ในช่วง 4 สัปดาห์ ไม่ปรากฏว่ามี grains ของโมเลกุลของมอร์พีนปรากฏเลย

3. ศึกษาอัตราการหลุดของโมเลกุลของมอร์พีนจากระบบประสาทส่วนกลางและเนื้อเยื่ออื่นๆ จากการศึกษาพบว่าที่สมองบริเวณ periaqueductal gray มีปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 หลังจากฉีดมอร์พีนกัมมันตรังสี หลังจากนั้นปริมาณ grains จะลดลงเรื่อยๆ โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 ชั่วโมงแรกและจะลดลงช้าๆ ในช่วงต่อมา (รูปที่ 8) เป็นที่ทราบกันดีว่าผลในการระงับปวดของมอร์พีนจะสูงสุดใน 1 ชม. แรกหลังจากฉีดยา หลังจากนั้นจะน้อยลง

ปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนที่ amygdala (รูปที่ 6) และ periventricular nuclei (รูปที่ 7) จะเพิ่มขึ้นในช่วง 1–3 ชม. หลังจากฉีดสารมอร์พีนกัมมันตรังสี หลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว ถ้าเปรียบเทียบอัตราการหลุดของ grains ใน 3 บริเวณนี้พบว่าในช่วงที่สาม (3–17 วันหลังจากฉีด) ไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 บริเวณ แต่ในช่วงแรกและช่วงที่สอง (1–3 ชม. และ 3–16 ชม.) มีความแตกต่างกันมาก ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า

มีความแตกต่างกันจริง ๆ หรือมี variation ในสัตว์ทดลองแต่ละตัวก็ได้ เนื่องจากในช่วงเวลาต่าง ๆ มีสัตว์ทดลองเพียงตัวเดียว ทำให้ไม่สามารถสรุปได้แน่นอน วิธีการแก้ไข คือ เพิ่มปริมาณสัตว์ทดลอง คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความจริงข้อนี้เช่นกันแต่เนื่องจากสารมอร์พีนกัมมันตรังสีมีราคาแพงมาก จึงจำเป็นต้องจำกัดสัตว์ทดลองและพยายามเลือกสัตว์ทดลองที่มีขนาด อายุและน้ำหนักใกล้เคียงกัน

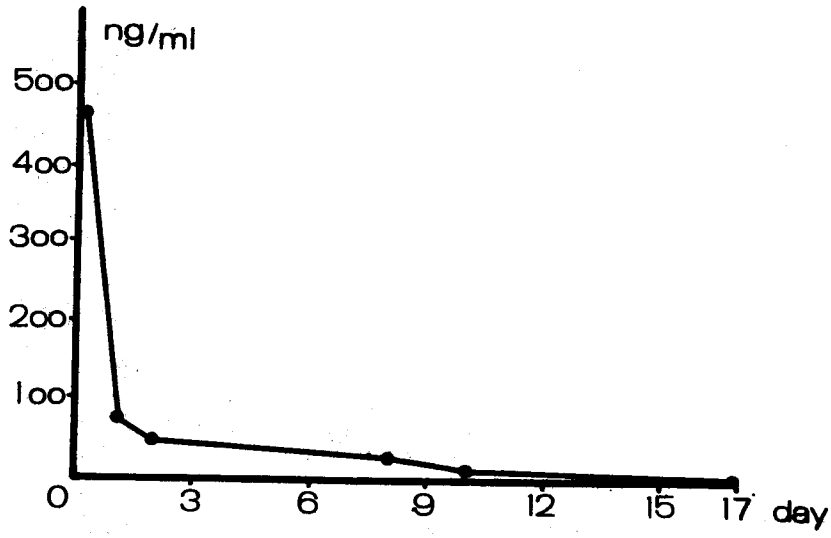
สำหรับระดับของมอร์พีนในพลาสม่าเมื่อเทียบกับปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนในสมอง พบว่าในช่วงต้นไม่ใคร่จะมีความสัมพันธ์กันนัก แต่ในช่วงหลังคือหลังวันที่ 3 ค่อนข้างจะสัมพันธ์กันดี การที่เป็นเช่นนี้อาจจะเนื่องจากว่าในการหาระดับของมอร์พีนในพลาสม่าปริมาณสารละลายมอร์พีนที่ฉีดครั้งสุดท้ายมีมากถึง 4 มก. และทำในสัตว์ทดลองคนละตัวกับการนับ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนในสมอง ซึ่งฉีดมอร์พีนในปริมาณที่น้อยกว่ากันมาก วิธีที่จะแก้ปัญหาว่าปริมาณของมอร์พีนในพลาสม่าและในสมองจะมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ อาจจะทำได้โดยการฉีดสารละลายมอร์พีนกัมมันตรังสีร่วมกับสารละลายมอร์พีนแล้วหาปริมาณของมอร์พีนในพลาสม่า ในขณะเดียวกันก็นับ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนในสมองด้วยแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่อาจมีข้อเสียคือสารละลายมอร์พีนอาจจะไปแย่งที่มอร์พีนกัมมันตรังสีในการจับกับ receptors ก็ได้ เนื่องจากปริมาณมากกว่า ซึ่งทำให้ปริมาณ grains ที่ปรากฏไม่ใช่ปริมาณของโมเลกุลที่จับกับ receptors อย่างแท้จริง ซึ่งอาจทำให้การแปลผลผิดไปได้

สำหรับในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น ตับ ไต ม้ามและกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่ามีอัตราการหลุดของ grains ของโมเลกุลของมอร์พีนช้ากว่าที่สมอง เพราะยังพบ grains อยู่มากในวันที่ 17 ถ้าเทียบกับเนื้อเยื่อสมอง การที่เป็นเช่นนี้ไม่สามารถอธิบายได้ นอกจากจะทำการศึกษาต่อไป ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ จะเห็นว่าโมเลกุลของมอร์พีนเมื่อรวมกับ receptor แล้วจะหลุดออกจาก receptors ได้อย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรกหลังจากฉีด เข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต แล้วถูกขับออกทางปัสสาวะ แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงมีโมเลกุลของมอร์พีนเกาะที่ receptors บริเวณ amygdala และ periaqueductal gray อยู่ ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับอารมณ์และการรับความรู้สึกเจ็บปวด ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยติดมอร์พีน แต่การที่จะรักษาผู้ป่วยที่ติดมอร์พีน โดยการตัดบางส่วนของสมอง เช่นที่

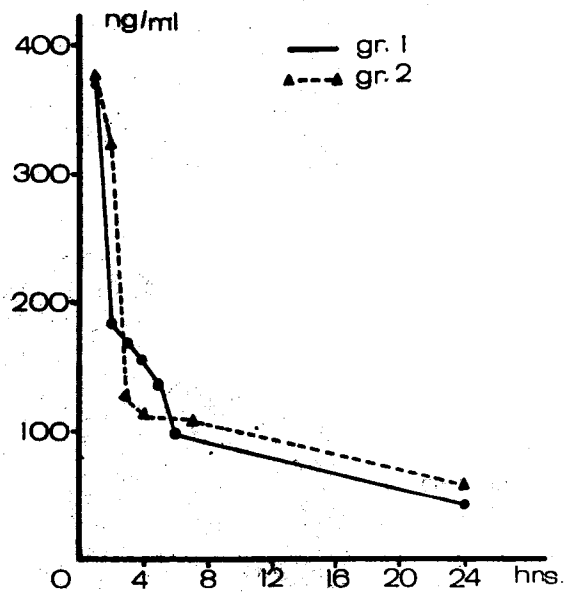
บริเวณ amygdala หรือทำลายบริเวณ periaqueductal gray คิดว่าไม่น่าจะเป็นไปได้ ทั้งนี้เนื่องจาก การทำลายบริเวณดังกล่าว จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการอื่นๆ ตามมาอีก เช่น การเปลี่ยนแปลงของอารมณ์อย่างมาก

ขอบคุณ

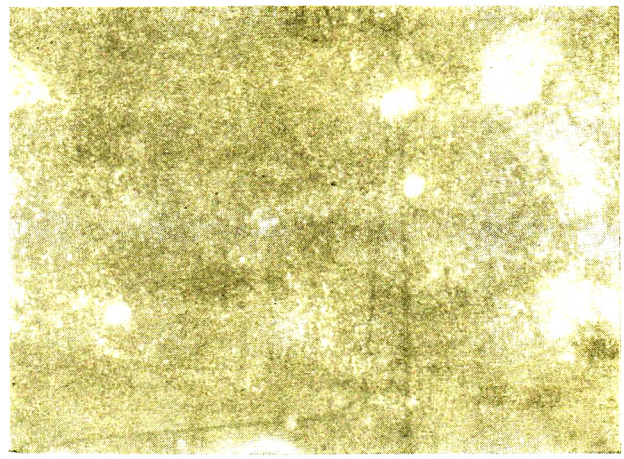
คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์บุญรักษ์ กาญจนโภคิน ศาสตราจารย์นายแพทย์ จรัส สุวรรณเวลา และรองศาสตราจารย์นายแพทย์วิชัย โปษยจินดา ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์นายแพทย์สุจินต์ อึ้งถาวร และอาจารย์สัตวแพทย์ชินวร พรหมชัยนันต์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคของออโตเรดิโอกราฟ ซึ่งใช้ในการวิจัยครั้งนี้



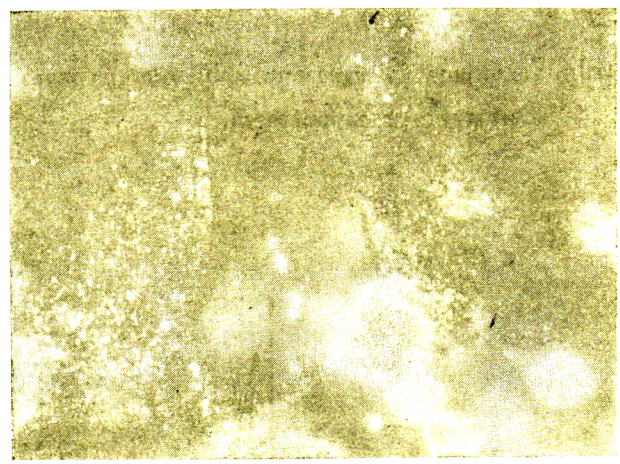
รูปที่ 1 กราฟแสดงปริมาณของอนุพันธ์ฝิ่นในพลาสม่าในเวลา 17 วัน หลังจากฉีดสารละลายมอร์ฟีนครั้งสุดท้ายในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 1



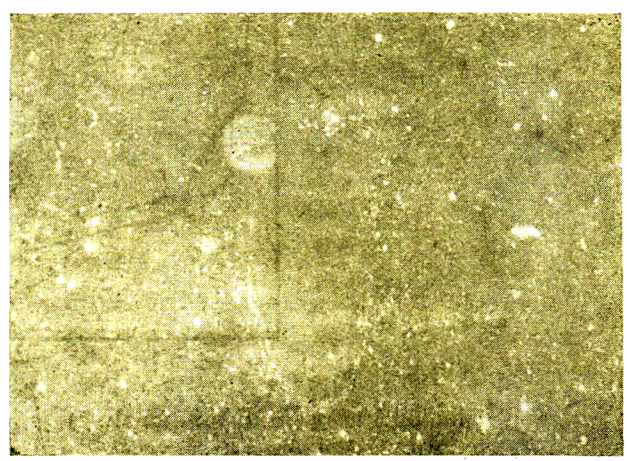
รูปที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณอนุพันธ์ฝิ่นในพลาสม่าใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดสารละลายมอร์ฟีนครั้งสุดท้ายระหว่างสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 1 (tolerance) และกลุ่มที่ 2 (nontolerance)



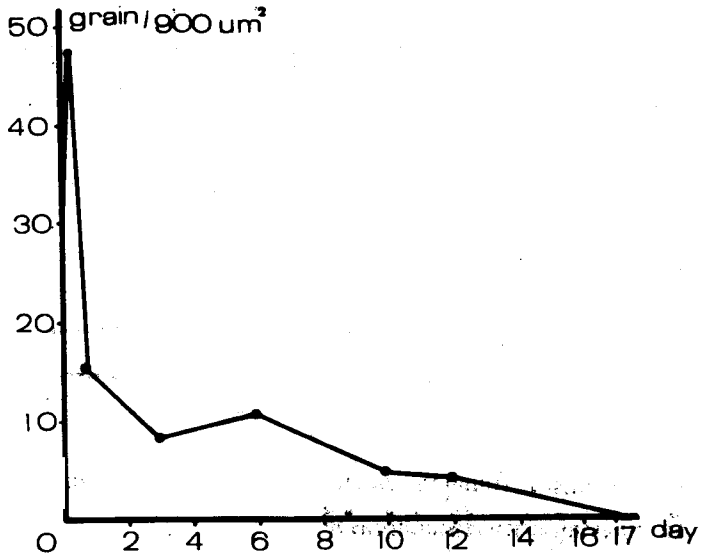
รูปที่ 3 แสดง silver grains ของโมเลกุลของมอร์ฟีนที่ปรากฏในสมองบริเวณ amygdala ให้สัตว์ทดลองที่มี survival time 1 ชั่วโมงหลังจากฉีดสารมอร์ฟีนกัมมันตรังสี Scale = 50 micra.



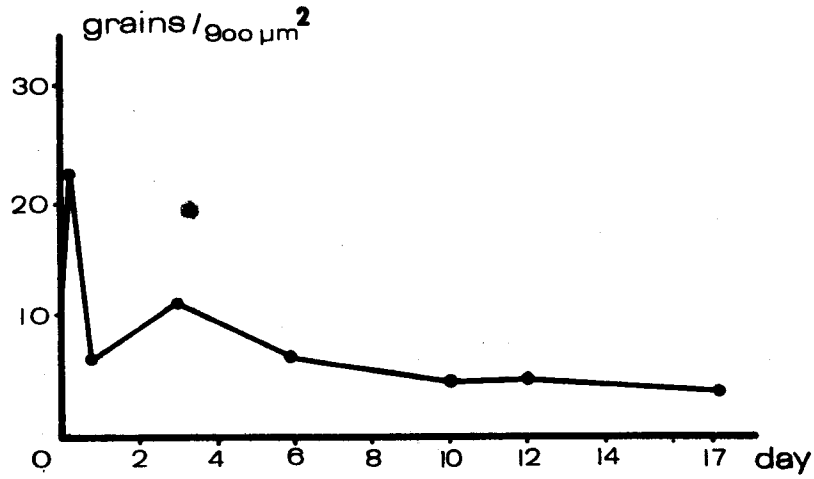
รูปที่ 4 แสดง silver grains ของโมเลกุลของมอร์ฟีนที่ปรากฏในสมองบริเวณ paraventricular nuclei ในสัตว์ทดลองที่มี survival time 1 ชั่วโมงหลังจากฉีดสารมอร์ฟีนกัมมันตรังสี Scale = 50 micra.



รูปที่ 5 แสดง silver grains ของโมเลกุลของมอร์ฟีนที่ปรากฏในสมองบริเวณ periaqueductal gray ในสัตว์ทดลองที่มี survival time 1 ชั่วโมงหลังจากฉีดสารมอร์ฟีนกัมมันตรังสี Scale = 50 micra.



รูปที่ 6 กราฟแสดงปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์ฟีนที่ปรากฏในสมองบริเวณ amygdala ในเวลา 17 วัน หลังจากฉีดสารมอร์ฟีนกัมมันตรังสี



รูปที่ 7 กราฟแสดงปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์ฟีนที่ปรากฏในสมองบริเวณ paraventricular nuclei ในเวลา 17 วันหลังจากฉีดสารมอร์ฟีนกัมมันตรังสี

รูปที่ 8 กราฟแสดงปริมาณ grains ของโมเลกุลของมอร์ฟีนที่ปรากฏในบริเวณ periaqueductal gray ในเวลา 17 วัน หลังจากฉีดสารมอร์ฟีนกัมมันตรังสี

อ้างอิง

1. Kuhar, M.J., Pert, C.B., Snyder, S.H. : Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain, Nature 245 : 447-450, 1973.
2. Mayer, D. : Anatomical substrates mediating analgesia : Synopsis of Proceedings from Neural Mechanism of Drug Abuse Conference 29-32, 1976.
3. Mellet, L.B., Wood, L.A. : The distribution and fate of morphine in the non-tolerant monkey, J. Pharmacol. Exp. Ther. 116 : 77-83, 1956.
4. Mule, S.J., Woods, L.A. : Distribution of N-C^{14} -methyl labelled morphine in central nervous system of nontolerant and tolerant dogs, J. Pharmacol. Exp. Ther. 136 : 232-241, 1962.
5. Pert, C.B., Snyder, S.H. : Opiate receptors - Demonstrations in nervous tissue, Science 179 : 1101-1104, 1973.
6. Pert, C.B., Yaksh, T. : Sites of morphine induced analgesia in the primate brain : relation to pain pathways Brain Res. 80 : 135-140, 1974.
7. Pert, C.B., snowman, A.M., Snyder, S.H. : Localization of opiate receptor binding in synaptic membranes of rat brain, Brain Res. 70 : 184-188, 1974.
8. Pert, C.B., hubar, M.J., Snyder, S.H. : Antoradiographic localization of the opiate receptor in the rat brain, Life Sci. 16 : 1849-1854, 1975.
9. Pert, C.B., Kuhar, M.J., Snyder, S.H. : Opiate receptor : Autoradiographic localization in rat brain, Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 3729-3733, 1976.
10. Roger, A.W., : Techniques of Autoradiograpy, 2 nd edition, Elsevier, Amsterdam, 1973.
11. Siminoff, R., Saunder, P.R. : Concentration of free and conjugated morphine in brain and other of tolerant and nontolerant rabbits, J. Pharmacol. Exp. Ther. 124 : 252-254, 1958.
12. Snyder, S.H. : The opiate receptor, Neurosci. Res. Prog. Bull, 13 : Supplement, 1975.
13. Snyder, S.H., Matthysse, S. : Opiate receptor mechanisms, Neurosci. Res. Prog. Bull. 13 : Supplement, 1675.
14. Spdector, S. : Quantitative determination of morphine in serum by radioimmuno-assay, J. Pharmacol. Exp. Ther. 178 : 253-258, 1971.
15. Teitelbaum, H., Blosser, J., Catravas, G. : Bilateral electroencephalographic response and unilateral tolerance to unilateral intracerebral morphine injection, Nature 260 : 158-159, 1976.