หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาบทบาทของยาเสพติดในสัตว์ทดลอง สิ่งที่สำคัญคือจะต้องทำให้สัตว์ทดลองเกิดการดื้อยา (tolerance) ขึ้น การทำให้เกิดการดื้อยาในสัตว์ทดลองทำได้หลายวิธี เช่น โดยการฝังเม็ดมอร์ฟีน (pellet implantation) การฉีดมอร์ฟีนเข้าไปบ่อยๆ ซึ่งอาจฉีดเข้าทางเส้นเลือด (intravenous) เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) และเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) วิธีที่นิยมคือฝังมอร์ฟีน ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และฉีดเข้าช่องท้อง ส่วนการฉีดเข้าทางเส้นเลือดมักไม่นิยม เนื่องจากสัตว์ทดลองมีขนาดเล็ก การฉีดเข้าเส้นเลือดจึงทำได้ค่อนข้างยาก นอกจากนี้การดูดซึมและการขับถ่ายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นผลการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรงเกินไป ส่วนการให้โดยทางปาก (oral administration) ไม่นิยมเพราะมอร์ฟีนออกฤทธิ์ได้ช้าและต้องใช้มอร์ฟีนเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมอร์ฟีนถูกดูดซึมทาง gastrointestinal tract ได้น้อย (Murphree , 1962) เพื่อความสะดวกและง่ายต่อการฉีดในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีการให้มอร์ฟีนโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

เนื่องจากไม่มีวิธีที่สามารถจะบอกได้ว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีนบ่อยๆ มีการดื้อยาเกิดขึ้นโดยดูลักษณะภายนอกของสัตว์ จึงมีผู้พยายามคิดหาวิธีที่จะทดสอบความดื้อยา โดยอาศัยคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนต่อสัตว์ทดลอง เช่นการทดสอบการระงับปวด, อัตราการหายใจ และการขยายของม่านตา เป็นต้น วิธีที่นิยมและใช้กันอย่างกว้างขวาง คือการทดสอบการระงับปวด (analgesia) ซึ่งวิธีการทดสอบมีหลายวิธี เช่น chemical tests, electrical tests, mechanical tests และ thermal tests (Banziger, 1964) แต่วิธีที่ใช้กันมาก คือ thermal tests เช่น วิธีของ D' Amour และ Smith (1941) โดยการสังเกตการกระดิกของหางหนูเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อนจากหลอดไฟฟ้าโดย

เปรียบเทียบเวลาที่เกิดการกระดิกของหางหนูก่อนได้รับการฉีดมอร์ฟีนกับหลังจากฉีดมอร์ฟีน พบว่าหลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปในหนูทดลองแล้วเวลาในการ response จะนานกว่าปกติ ซึ่งต่อมา Way และคณะ (1969) ได้นำหลักการของ D' Amour และ Smith ไปใช้ในการทดสอบว่ามีการดื้อยามอร์ฟีนเกิดขึ้นในสัตว์ทดลองได้ Grotto และ Sulman (1967) และ Cochin (1968) ได้ทดลองใช้ความร้อนจากน้ำที่อุณหภูมิ 58± 1 องศาเซลเซียส เป็นตัวกระตุ้นที่หางหนูแทนการใช้ความร้อนจากหลอดไฟฟ้า ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีวัด analgesia แบบของ Cochin (1968) ไปประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้ว่าหนูเกิดพัฒนาการดื้อยาและวัดองศาของความดื้อยา

เมื่อทดลองให้ปลายหางหนูจุ่มในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าไม่มีการ response ของหางหนู แต่เมื่อให้ปลายหางหนูจุ่มในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 58± 1 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าหางหนูเกิดการกระดิกขึ้นโดยใช้เวลาเฉลี่ยของการกระดิก 2.0± 0.7 วินาที และเมื่อนำหนูกลุ่มเดียวกันนี้มาฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ทำการทดสอบเช่นเดิมพบว่าหางหนูมีการ response ปกติเกิดขึ้นไม่ว่าจะวัดที่ช่วงเวลาใดๆหลังจากฉีด (ตารางที่ 4 หน้า 47) แต่เมื่อนำหนูอีกกลุ่มหนึ่งมาฉีดมอร์ฟีนจำนวน 10 มก./กก.น้ำหนักตัว พบว่าหางหนูสามารถจะจุ่มอยู่ในน้ำร้อนได้นานกว่าปกติ ไม่ว่าจะทำการทดสอบที่ช่วงเวลาใดๆหลังจากฉีดและการ response ของหางหนูจะค่อยๆกลับสู่สภาวะปกติหลังจากได้รับมอร์ฟีนนานประมาณ 140 นาที (ตารางที่ 5 หน้า 49) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าวิธีการทดสอบอันนี้สามารถแสดงถึงผลของการออกฤทธิ์ทางเภสัชของมอร์ฟีนได้ และมอร์ฟีนจะออกฤทธิ์ในการระงับปวด (หางหนูจุ่มในน้ำร้อนได้นานตั้งแต่ 10 วินาทีขึ้นไป) ในหนูทั้ง 10 ตัว หลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปแล้วที่ช่วงเวลา 40-60 นาที ซึ่งผลการทดลองอันนี้สอดคล้องกับที่ D' Amour และ Smith (1941) ได้ทำการศึกษาในหนู rat โดยฉีดมอร์ฟีนเข้าช่องท้อง และสอดคล้องกับ Patrick และคณะ (1975) ที่ศึกษาในหนู rat และหนู mice เมื่อฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนัง เนื่องจากวิธีทดสอบอันนี้ไม่สามารถจะหาเวลาที่แน่นอนในการ response ของหางหนูในช่วงเวลาที่

มอร์ฟีนออกฤทธิ์สูงสุดได้ ทั้งนี้เพราะหากหางหนูจุ่มอยู่ในน้ำร้อนนานเกินไปจะทำให้เซลล์บริเวณปลายหางหนูเสียและเกิดการบวมขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้กำหนดไว้ว่าถ้าหางหนูสามารถจะจุ่มอยู่ในน้ำร้อนได้นานตั้งแต่ 10 วินาทีขึ้นไป ถือว่าเป็นการเกิด complete analgesia ส่วนวิธีของ D' Amour และ Smith ใช้เวลา 8 วินาที เป็นตัวบ่งถึง complete analgesia

ผลการทดลองในตารางที่ 7, 8 และ 9 แสดงให้เห็นว่าถ้าทำการทดสอบ analgesia ที่เกิดขึ้นหลังจากหนูทดลองได้รับการฉีดมอร์ฟีนจำนวน 5, 8 และ 10 มก./กก.น้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน การออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนจะค่อยๆลดลง ทั้งนี้โดยการสังเกตค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia ไม่ว่าจะวัดที่เวลาใดๆและใช้ขนาดของมอร์ฟีนเท่าใดก็ตาม ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าการฉีดมอร์ฟีนบ่อยๆสามารถทำให้สัตว์ทดลองเกิดพัฒนาการดื้อยาต่อการระงับปวดได้ (tolerance to analgesic effect) ดังนั้นจึงใช้การพัฒนาการดื้อยาต่อการระงับปวดนี้เป็นตัวบ่งชี้ว่าสัตว์ได้เกิดการดื้อยาต่อมอร์ฟีนขึ้น หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าหนูทดลองเกิดการดื้อยาต่อมอร์ฟีนขึ้นได้ เมื่อได้รับมอร์ฟีนปริมาณคงที่ติดต่อกันเป็นเวลาหลายๆวัน

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมอร์ฟีนกับค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia ดังผลการทดลองในตารางที่ 10 จะเห็นว่าค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของมอร์ฟีนไม่ว่าจะทำการวัดหลังจากฉีดมอร์ฟีนที่ช่วงเวลาใดๆ ถ้าทำการทดลองในทำนองเดียวกันนี้ในหนูทดลองที่ดื้อยามอร์ฟีนมาก่อนแล้วก็ยังคงพบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของมอร์ฟีนที่ใช้กับค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia (ตารางที่ 11) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูก่อนดื้อยากับหลังจากถูกทำให้ดื้อยาแล้ว ไม่มีความแตกต่างกัน ดังรูปที่ 9 หน้า 59 นั่นคือจำนวนหนูที่เกิด complete analgesia มากที่สุดในช่วง 40-60 นาที โดยอาศัยผลการ

ทดลองดังกล่าวจึงเห็นได้ว่าหากจะวัดความรุนแรงของการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีน เมื่อทำการทดสอบ analgesic response ควรทำได้ที่เวลา 40 หรือ 60 นาที ดังนั้นในการทดลองตลอดงานวิจัยนี้จึงทำการวัดการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนหลังจากฉีดนาน 40 นาที

จากผลของการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบ analgesia ที่ทำการศึกษานี้สามารถจะทดสอบให้เห็นถึงลักษณะการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในสัตว์ทดลองได้ นอกจากนี้ยังใช้ทดสอบได้ว่าสัตว์ทดลองมีการดื้อยาเกิดขึ้น วิธีนี้มีข้อดี คือสะดวก ง่าย และใช้เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยาก ซึ่งสามารถพบในห้องปฏิบัติการได้ทั่วไป จึงสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย แต่ก็มีข้อเสีย คือไม่สามารถจะบอกเวลาที่แน่นอนของการ response ของหางหนูในขณะที่มอร์ฟีนกำลังออกฤทธิ์สูงสุด

เพื่อเป็นการยืนยันว่าการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนรุนแรงที่สุดในช่วง 40 หรือ 60 นาที จึงได้ทำการศึกษาระดับของมอร์ฟีนทั้งในซีรั่มและในสมองโดยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเส่ย์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง ค่าของมอร์ฟีนที่ตรวจได้เป็นทั้งค่ารวมของสารที่มีปฏิกิริยาอิมมูโนคล้ายมอร์ฟีน จากผลการทดลองในตารางที่ 12 หน้า 60 และรูปที่ 10 หน้า 61 สามารถจะตรวจพบมอร์ฟีนได้ทั้งในซีรั่มและในสมองหลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปแล้ว 5 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามอร์ฟีนที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถจะถูกดูดซึมเข้าเส้นเลือดได้อย่างรวดเร็ว ระดับของมอร์ฟีนทั้งในซีรั่มและในสมองจะค่อยๆเพิ่มขึ้นและจะมีค่าสูงสุดในช่วง 40-60 นาที หลังจากนั้นจะค่อยๆลดลง ซึ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับมอร์ฟีนทั้งในซีรั่มและในสมองจะสัมพันธ์กับการเกิด analgesia ผลการทดลองอันนี้คล้ายกับการทดลองของ Patrick และคณะ (1975) ที่ศึกษาในหนู rat และหนู mice กับ Hipps และคณะ (1976) ที่ทำการศึกษาในหนู rat ซึ่งผลการทดลองนี้จะช่วยเสริมอีกครั้งหนึ่งว่าช่วงการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนสูงสุดควรจะอยู่ในช่วงระหว่าง 40-60 นาที

เนื่องจากลักษณะและรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูที่ถูกทำให้เกิดการดื้อยาแล้วจะไม่แตกต่างจากหนูปกติ ดังนั้นในการทดลองหาค่า AD_{50} สำหรับงานวิจัยนี้

จึงหาหลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปแล้วนาน 40 นาที ดังกล่าวแล้วข้างต้น เมื่อทำการทดลองวัดความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia กับความเข้มข้นของมอร์ฟีนในหนูทดลองที่พัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนมากขึ้นจนถึงขนาด 33 มก./กก.น้ำหนักตัว ลักษณะและรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนจะยังคงเหมือนกับในหนูปกติซึ่งไม่ได้ติดยา (ไม่ได้รายงานผล) คือจำนวนหนูที่เกิด complete analgesia มากที่สุดที่ 40 หรือ 60 นาที เช่นกัน

วิธีการทำให้สัตว์ทดลองพัฒนาการดื้อยาต่อมอร์ฟีนในอดีต มักทำโดยการฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนังทุกๆวัน ซึ่งในระหว่างการฉีดจะเพิ่มขนาดของยาขึ้นไปเรื่อยๆจนถึงจุดๆหนึ่ง แล้วอนุมานว่าสัตว์ทดลองเกิดการดื้อยาขึ้นแล้ว จะเห็นได้ว่าวิธีนี้เป็นการเพิ่มขนาดของยาเพื่อทำให้หนูเกิดการดื้อยามอร์ฟีนที่ขนาดสูงๆโดยไม่มีหลักเกณฑ์ใดๆ การเพิ่มขนาดของมอร์ฟีนที่ไม่เหมาะสมและไม่มีหลักเกณฑ์นี้จะทำให้ไม่สามารถควบคุมการทดลองเพื่อพัฒนาการดื้อยาอย่างมีระเบียบ ยิ่งไปกว่านั้นหากขนาดของมอร์ฟีนที่ใช้เพิ่มสูงเกินไปอาจทำให้สัตว์ทดลองตาย

ในการวิจัยนี้ใช้ค่า AD_{50} ซึ่งหาได้จากการวัด analgesia ของหนูตามวิธีข้อ 4 และรูปที่ 7 และใช้ค่า AD_{50} เป็นขนาดของมอร์ฟีนที่ใช้ฉีดเพิ่มให้กับสัตว์ทดลองเพื่อพัฒนาการดื้อยา ทั้งนี้จะต้องหาค่า AD_{50} ของหนูทดลองก่อนฉีดมอร์ฟีนเป็นขนาดของยาเริ่มต้นที่ใช้ฉีดและในระหว่างพัฒนาการดื้อยาก็จะเพิ่มขนาดของมอร์ฟีนขึ้นไปเรื่อยๆด้วยค่า AD_{50} ที่หาได้ในหนูทดลอง นอกจากนี้ค่า AD_{50} ที่วัดได้ในหนูทดลองที่ติดยานี้ยังเป็นตัวเลขที่ใช้บอกถึงองศาของการดื้อยาได้ด้วย

ในการทดลองนี้ได้ทำให้หนูทดลองค่อยๆเกิดพัฒนาการดื้อยา โดยการฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนังวันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง ในวันที่ 1 ฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก. น้ำหนักตัว จนครบ 3 วัน ในวันที่ 4 เพิ่มขนาดของยาเป็น 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 8 เพิ่มขนาดของยาเป็น 16.6 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 12 เพิ่มขนาดของยาเป็น 33 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดจน

ครบ 5 วัน โดยวิธีการเพิ่มขนาดของมอร์ฟีน ด้วยค่า AD_{50} ในระหว่างการฉีดสามารถทำให้หนูทดลองค่อยๆเกิดการพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนที่ปริมาณของมอร์ฟีนขนาดสูงๆ ได้ จากผลการทดลองในรูปที่ 11 หน้า 64 จะเห็นว่าค่า AD_{50} เพิ่มจาก 5 มก./กก. น้ำหนักตัว มาเป็น 100 มก./กก.น้ำหนักตัว ในช่วงระยะเวลา 16 วัน ซึ่งค่า AD_{50} จะเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่า การที่ไม่สามารถพัฒนาการดื้อยาให้ค่า AD_{50} สูงไปกว่านี้ ได้เนื่องจากมีความจำกัดการละลายของมอร์ฟีนใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ และปริมาตรของมอร์ฟีนที่ใช้ฉีดในหนูทดลอง (จากการทดลองพบว่ามอร์ฟีนละลายใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ได้สูงสุด 50 มก./มล.) ถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มขนาดของยาด้วยค่า AD_{50} ที่หาได้ก็ยังปรากฏว่าสัตว์ทดลองมีการตายเกิดขึ้น (8 ตัวใน 30 ตัว) หลังจากที่เพิ่มขนาดของยาเป็น 33 มก./กก.น้ำหนักตัว นาน 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสัตว์ทดลองถึงแม้จะเป็น species เดียวกัน ให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมอันเดียวกัน ความสามารถในการเกิดการดื้อยาก็ยังต่างกัน ทั้งนี้อาจจะขึ้นอยู่กับสาเหตุอื่นๆอีกด้วยก็ได้

เมื่อวัดการกระจายของมอร์ฟีนในส่วนต่างๆของสมองโดยแบ่งส่วนของสมองออกเป็น 5 ส่วน cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain, cerebellum และ pons + medulla โดยแบ่งตามหน้าที่และตำแหน่ง (รูปที่ 8ข หน้า 39) แต่ละส่วนของสมองจะมีขนาดไม่เท่ากันโดยเฉลี่ย cortex หนักประมาณ 0.96 กรัม, thalamus + hypothalamus หนัก 0.15 กรัม, midbrain 0.17 กรัม, cerebellum 0.28 กรัม และ pons + medulla 0.22 กรัม เมื่อศึกษาปริมาณมอร์ฟีนในส่วนของสมองทั้ง 5 ส่วน พบว่าใน cerebellum และ thalamus + hypothalamus มีปริมาณมอร์ฟีน/กรัมของสมองมากที่สุดและมีค่าน้อยที่สุดในบริเวณ cortex และ midbrain (ตารางที่ 13 หน้า 63) ซึ่งผลการทดลองของ Bullock และคณะ (1977) รายงานเช่นเดียวกันว่าในบริเวณ cerebellum จะมีความเข้มข้นมอร์ฟีนมากที่สุด นอกจากนี้เขายังได้ศึกษาการกระจายของมอร์ฟีนในสมองหนู rat ส่วนต่างๆในระดับ subcellular fraction พบว่าในแต่ละส่วนของสมองมีการกระจายของ

มอร์ฟีนใน subcellular fraction เหมือนๆกันคือ fraction ที่พบระดับมอร์ฟีนมากที่สุดคือ supernatant ที่ได้จากการปั่น 100,000 xg และพบปริมาณมอร์ฟีนเล็กน้อยในส่วนของ crude nuclei, mitochondrial fraction และ microsomal fraction จากการรายงานของ Pert และคณะ (1974) พบว่าreceptor ของฝิ่นในสมองหนู rat จะมีมากที่สุดใน mitochondrial fraction ผลจากการทดลองของ Bullock และคณะ ดังกล่าว เป็นการสนับสนุนว่าการกระจายปริมาณของมอร์ฟีนในสมองไม่น่าจะมีความสัมพันธ์กับการกระจายปริมาณของ receptor ของฝิ่น อย่างไรก็ตามการกระจายปริมาณของมอร์ฟีนในสมองอาจจะขึ้นอยู่กับสาเหตุหลายประการ เช่นปริมาณมอร์ฟีนที่ตรวจพบอาจจะอยู่ได้ทั้งนอกเซลล์ (extracellular) ภายในเซลล์ (intracellular) และช่องว่างระหว่างเซลล์ (interstitial cell) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับอัตราการหมุนเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงในแต่ละส่วนของสมอง (rate of blood flow) ขนาดของหลอดเลือด (vascularity) และ turnover ของมอร์ฟีนในเซลล์สมองอีกด้วย

วิธีการวัด cyclic AMP โดยทั่วไปอาศัยคุณสมบัติของ cyclic AMP ซึ่งมีอยู่หลายวิธี เช่นวิธีของ Turtle และ Kipnis (1967) ใช้วิธีแยก cyclic AMP ที่เกิดขึ้นโดย thin layer chromatography แล้วเปลี่ยน cyclic AMP ให้เป็น 5'-AMP โดยใช้เอ็นไซม์ 3', 5' nucleotide phosphodiesterase หลังจากนั้นเปลี่ยน 5'-AMP ให้เป็น ADP โดยให้ 5'-AMP ทำปฏิกิริยากับ ^{32}P-ATP เมื่อมีเอ็นไซม์ myokinase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ^{32}P-ADP ที่เกิดขึ้น แยกออกโดยใช้ thin layer chromatography van de Werve และคณะ (1974) วัดระดับ cyclic AMP โดยอาศัยคุณสมบัติที่ว่า cyclic AMP สามารถกระตุ้นเอ็นไซม์ phosphorylase ได้ แต่ทั้ง 2 วิธีนี้มีความยุ่งยาก ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธี competitive protein binding โดยอาศัยหลักการง่ายๆที่ว่า cyclic AMP มีความสามารถในการแย่งที่ H^3-cyclic AMP ซึ่งจับอยู่กับ binding

protein และความสามารถในการแย่งที่จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ cyclic AMP ที่ใช้วิธีนี้มีข้อดี คือใช้เวลาสั้น และมีความไวสูง สามารถจะตรวจหาระดับ cyclic AMP ได้ถึงขนาด 2 พิโคโมล ในการวัดโดยวิธีนี้ต้องเตรียม binding protein เสียก่อน ซึ่งในการทดลองได้เตรียม binding protein จากส่วน cortex ของต่อมหมวกไตวัว Walton และ Garren (1970) ได้รายงานว่า binding protein ที่เตรียมจากต้องหมวกไตของวัวจะมีความสามารถในการจับกับ cyclic AMP สูงกว่าในอวัยวะอื่นๆ Isang และคณะ (1972) ได้รายงานว่า binding protein ที่ใช้ในการหาปริมาณ cyclic AMP ไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์สูง จากผลการศึกษา binding protein ที่เตรียมขึ้นจากต่อมหมวกไตวัว โดยการปั่น 105,000 xg จะมี binding affinity สูงกว่าที่เตรียมได้จากการปั่น 27,000 xg เมื่อให้ปริมาณโปรตีนเท่ากัน (รูปที่ 13 หน้า 67) ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ binding protein ที่เตรียมได้จากการปั่น 105,000 xg จากการรายงานของ Gill และ Garren (1969), Walton และ Garren (1970), Brown และคณะ (1970), Isang และคณะ (1972) พบว่า binding protein จากต่อมหมวกไตของวัว สามารถจะจับกับ cyclic AMP ได้ดีกว่า ATP, ADP, AMP, cyclic IMP, cyclic GMP จากผลของการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ ATP ที่น้อยที่สุดซึ่งไม่สามารถแย่งที่ H^3-cyclic AMP ซึ่งจับอยู่กับ binding protein (0.22 มิลลิกรัม) คือ 0.833 n mole/250 µl Grenell และคณะ (1955) ได้รายงานถึงระดับ ATP ในแต่ละส่วนของสมองหนู เมื่อคำนวณเป็นเนื้อของ ATP ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างในการวัดปริมาณ cyclic AMP แต่ละครั้ง จะมีเนื้อน้อยกว่า 0.833 n mole ประมาณ 3 เท่า ดังนั้นปริมาณ ATP ในสารตัวอย่างจึงไม่น่าจะรบกวนการวัดปริมาณ cyclic AMP

การวัดปริมาณ cyclic AMP ในสารตัวอย่างทุกครั้ง เลือกใช้ปริมาณโปรตีนของ binding protein 0.22 มิลลกรัม (รูปที่ 13 หน้า 67) และความ

เข้มข้นของ H^3-cyclic AMP 0.96 พิโคโมล (รูปที่ 14 หน้า 69) พร้อมทั้งสร้างกราฟมาตรฐานของ cyclic AMP ควบคู่ไปด้วย โดยใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyclic AMP ในการแย่งที่ H^3-cyclic AMP อยู่ในช่วง 2-16 พิโคโมล (รูปที่ 15 หน้า 71)

ในการศึกษาประสิทธิภาพของการสะกัด cyclic AMP ออกจากสมอง โดยเติม H^3-cyclic AMP กับ cyclic AMP มาตรฐานที่มีปริมาณตั้งแต่ 250-1,000 พิโคโมล ลงไปใน homogenate ของสมองซึ่งสะกัดด้วย 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก จากผลการทดลองในตารางที่ 15 พบว่าจะได้ % recovery อยู่ในช่วงประมาณ 90 เปอร์เซนต์

Walton และ Garren (1970) ได้รายงานว่า 5% กรดไตรคลอโร-อะซิติก (TCA) สามารถยับยั้งการจับของ H^3-cyclic AMP กับ binding protein ได้ ดังนั้นในการทดลองซึ่งใช้ 6% TCA ในการสะกัด cyclic AMP ออกจากสมอง จึงจำเป็นจะต้องกำจัด TCA ออกจากสารตัวอย่างเสียก่อน เมื่อทำการทดลองดูผลของ TCA ต่อความสามารถในการจับกันของ H^3-cyclic AMP กับ binding protein พบว่าถ้ามีเนื้อ TCA อยู่ 0.6 มิลลิกรัม จะยับยั้งปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อทำให้เนื้อ TCA ลดลง 10 เท่า (0.06 มิลลิกรัม) ความสามารถในการยับยั้งจะหมดไป การขจัด TCA ออกทำได้โดยการล้างสารละลายด้วยอีเธอร์ซึ่งอิ่มตัวด้วยน้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง

นอกจากนี้ยังได้ทดลองศึกษาผลของ TCA ที่ยังเหลือค้างอยู่หลังจากขจัดออกด้วยอีเธอร์ซึ่งอิ่มตัวด้วยน้ำทำถึง 4 ครั้ง ต่อการวัดระดับ cyclic AMP โดยเติมเนื้อสารมาตรฐาน cyclic AMP ที่ทราบปริมาณแน่นอน คือ 1,000 , 2,000 และ 4,000 พิโคโมล ลงไปในสารละลายที่สะกัดได้จากสมอง แล้ววัดปริมาณ cyclic AMP โดยวิธี competitive protein binding พบว่าสามารถหา % recovery ได้ 100 เปอร์เซนต์ แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ

TCA ถ้าหากจะมีเหลืออยู่บ้าง ในการสะกัด cyclic AMP โดยวิธีนี้ก็จะไม่มีผลต่อการวัดระดับ cyclic AMP

Camer และคณะ (1971) กับ Ebadi และ Costa (1971) ได้ศึกษาการกระจายของ cyclic AMP ในบริเวณส่วนต่างๆของสมองหนู rat พบว่าในบริเวณ cerebellum มีระดับ cyclic AMP สูงที่สุด รองลงมาคือ spinal cord, thalamus, hypothalamus, telencephalon พบน้อยที่สุดคือ pons + medulla และ midbrain จากการศึกษาของ Weiss และ Costa (1968) พบว่าใน cerebellum มีระดับเอ็นไซม์ adenylate cyclase ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสมองส่วนอื่นๆ (0.2 mμ moles cyclic AMP formed/mg protein/min) ในขณะที่ระดับเอ็นไซม์ phosphodiesterase มีค่าต่ำสุด (7 mμ moles cyclic AMP hydrolyzed/mg protein/min) ในการทดลองนี้ได้ศึกษาระดับ cyclic AMP ในบริเวณทั้ง 5 ส่วนของสมองในหนูที่ได้รับการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ หนูที่ทำให้เกิดการติ้อยาที่ระดับของศาการติ้อยาต่างๆกัน และหนูที่ได้รับยาแบบเฉียบพลัน โดยวัดหลังจากฉีด 40 นาที จากการศึกษาในหนูปกติพบว่าระดับ cyclic AMP มีค่าสูงที่สุดในส่วน cerebellum 12.50± 3.64 n mole/g wet weight รองลงมาคือ thalamus + hypothalamus และ cortex 4.75± 0.57 และ 3.50±0.76 n mole/g wet weight ตามลำดับ พบน้อยที่สุดคือ midbrain และ pons + medulla 2.48± 0.50 และ 2.53± 0.92 n mole/g wet weight ตามลำดับ ซึ่งการกระจายของระดับ cyclic AMP ในบริเวณส่วนต่างๆของสมองคล้ายกับที่ Camer และคณะ กับ Ebadi และ Costa ได้ทำการศึกษาไว้ เมื่อศึกษาระดับ cyclic AMP ในบริเวณทั้ง 5 ส่วนของสมองในหนูที่ได้รับการฉีด 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ติดต่อกันเป็นเวลา 3, 7, 11 และ 16 วัน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 15 หน้า 74)

เมื่อศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP ในบริเวณทั้ง 5 ส่วนของสมองในหนูที่พัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนที่ระดับการดื้อยาต่างๆกัน (ตารางที่ 16) พบว่าบริเวณ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain และ cerebellum ระดับ cyclic AMP จะเริ่มลดลงเมื่อระดับการดื้อยาสูงกว่า 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ในขณะที่สมองส่วน pons + medulla ระดับ cyclic AMP จะไม่เปลี่ยนแปลงถึงแม้ว่าหนูจะมีระดับการดื้อยาขึ้นถึง 100 มก./กก.น้ำหนักตัว จากการรายงานของ Kuharและคณะ (1973) พบว่ามี receptor ของฝิ่นในสมองส่วน cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain ค่อนข้างสูงกว่าสมองส่วน pons + medulla สำหรับสมองส่วน cerebellum เกือบจะไม่มี receptor ของฝิ่นเลย (Pert และ Snyder , 1973; Pert และคณะ, 1976) แต่มีผู้รายงานว่ามอร์ฟีนออกฤทธิ์ต่อสมองส่วน cerebellum ด้วย (Messing และคณะ, 1978; Roffman และคณะ, 1977; Clouet และคณะ, 1975) จากการทดลองของ Ho และคณะ (Ho และคณะ, 1972 a; Ho และคณะ, 1973a; Ho และคณะ, 1975) สนับสนุนว่า cyclic AMP มีส่วนเกี่ยวข้องในขบวนการเกิดการดื้อยามอร์ฟีน โดยมีผลต่อระบบการสังเคราะห์โปรตีนหรือ biomolecule ดังนั้นจึงคิดว่าระดับ cyclic AMP น่าจะถูกใช้ไปอย่างมากเพื่อใช้ในขบวนการเกิดการดื้อยามอร์ฟีน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ระดับ cyclic AMP ลดลง

เมื่อเปรียบเทียบระดับ cyclic AMP ในหนูที่ได้รับยาแบบเฉียบพลันกับหนูที่ทำให้มีการดื้อยาเกิดขึ้นที่ปริมาณมอร์ฟีนต่างๆกัน (รูปที่ 16ก, ข, ค, ง และ จ) พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับ cyclic AMP ในบริเวณ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain และ cerebellum ของหนูทั้ง 2 พวก ที่ปริมาณมอร์ฟีน 5, 8.7, 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว ยกเว้นในบริเวณ cerebellum ที่พบว่าหลังจากทำให้หนูติดยา 5 มก./กก.น้ำหนักตัว เมื่อเพิ่มปริมาณมอร์ฟีนอย่างเฉียบพลัน 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP จะไม่

แตกต่างกับหนูที่ได้รับยาอย่างเฉียบพลัน และหนูที่ติดยาที่ปริมาณมอร์ฟีน 5 มก./กก. น้ำหนักตัว แต่เมื่อทำให้หนูติดยา 5 และ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP จะลดลงกว่าหนูที่ติดยา 5 มก./กก.น้ำหนักตัว จึงทำให้หนูที่ได้รับยาอย่างเฉียบพลัน 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว มีระดับ cyclic AMP สูงกว่าหนูที่ติดยา 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ส่วนในบริเวณ pons + medulla พบว่าการได้รับยาอย่างเฉียบพลันจะมีผลต่อระดับ cyclic AMP ในบริเวณนี้มากกว่าสมองส่วนอื่นๆ เมื่อให้ปริมาณมอร์ฟีนอย่างเฉียบพลัน 5, 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP มีค่าสูงกว่าหนูที่ดื้อยา 5 และ 8.7 กม./กก.น้ำหนักตัว เมื่อทำให้หนูดื้อยามากกว่า 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP ในหนูที่ได้รับยาอย่างเฉียบพลัน 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว จะไม่แตกต่างจากหนูที่ติดยา 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. เมื่อศึกษาลักษณะและรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูทดลองโดยอาศัยฤทธิ์ทางเภสัชของมอร์ฟีนในการระงับปวด (analgesia) เป็นตัวทดสอบ จากผลของการทดสอบแสดงให้เห็นว่ามอร์ฟีนที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลองจะค่อยๆ ออกฤทธิ์และออกฤทธิ์มากที่สุดในช่วง 40-60 นาที หลังจากนั้นการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนจะค่อยๆลดลง และในที่สุดจะหมดไปหลังจากฉีดเข้าไปนานถึง 140 นาที (ดูจากค่าเปอร์เซนต์ของหนูที่เกิด complete analgesia)

2. วิธีการทดสอบนี้สามารถแสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับการฉีดมอร์ฟีนปริมาณ 5, 8, 10 มก./กก.น้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลาหลายๆวัน การออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในการระงับปวดจะค่อยๆลดลง ซึ่งใช้การลดลงของการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนเป็นดัชนีบ่งว่าหนูมีการดื้อยามอร์ฟีนเกิดขึ้น

3. ลักษณะและรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูกลุ่มปกติจะไม่แตกต่างจากหนูที่พัฒนาการดื้อยา ไม่ว่าหนูทดลองจะมีการดื้อยาที่ระดับองศาของการดื้อยาเท่าใดก็ตาม นั่นคือจำนวนของหนูทดลองที่เกิด complete analgesia มากที่สุดในช่วง 40-60 นาที

4. ลักษณะและรูปแบบการออกฤทธิ์ของมอร์ฟีนในหนูปกติจะสัมพันธ์กับปริมาณของมอร์ฟีนในซีรั่มและในสมอง นั่นคือปริมาณของมอร์ฟีนทั้งในซีรั่มและในสมองจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ช่วงเวลา 40-60 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มอร์ฟีนออกฤทธิ์ในการระงับปวดได้สูงสุด

5. เมื่อศึกษาการกระจายของมอร์ฟีนในบริเวณส่วนต่างๆของสมองหนู คือ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain, cerebellum และ pons + medulla พบว่าในบริเวณ cerebellum และ thalamus + hypothalamus มีปริมาณมอร์ฟีน/กรัมของสมองมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 103.75 $\pm$ 19.72 และ 103.47 $\pm$ 23.97 ng/g สมอง ตามลำดับ รองลงมาคือ pons + medulla เท่ากับ 99.94 $\pm$ 11.31 ng/g สมอง และมีค่าน้อยที่สุดในบริเวณ cortex และ midbrain เท่ากับ 73.63 $\pm$ 9.05 และ 80.68 $\pm$ 14.26 ng/g สมอง ตามลำดับ

6. ใช้วิธีการทดสอบ analgesia ในการหาค่า AD_{50} โดยทดสอบเวลาหลังจากฉีดมอร์ฟีนเข้าไปแล้ว 40 นาที ซึ่งใช้ค่า AD_{50} เป็นปริมาณของมอร์ฟีนที่ใช้ฉีดเข้าไปในหนูทดลองเพื่อพัฒนาการดื้อยาและในระหว่างการฉีดจะเพิ่มปริมาณของยาขึ้นไปเรื่อยๆด้วยค่า AD_{50} ที่หาได้ในแต่ละช่วง นอกจากนี้ค่า AD_{50} ยังเป็นตัวที่ใช้ในการบ่งถึงองศาของการดื้อยาในเมื่อหนูทดลองถูกทำให้มีการดื้อยาที่ช่วงเวลาต่างๆกัน

ในการทดลองนี้ได้ใช้การทำให้หนูทดลองค่อยๆพัฒนาการดื้อยาโดยการฉีดมอร์ฟีนเข้าใต้ผิวหนังวันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง โดยเริ่มจากการฉีดมอร์ฟีน 5 มก./กก.น้ำหนักตัว จนครบ 3 วัน ในวันที่ 4 เพิ่มขนาดของยาเป็น 8.7 มก./กก. น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 8 เพิ่มขนาดของยาเป็น 16.6 มก./กก. น้ำหนักตัว ฉีดจนครบ 4 วัน ในวันที่ 12 เพิ่มขนาดของยาเป็น 33 มก./กก.น้ำหนักตัว

ฉีดจนครบ 5 วัน โดยวิธีการให้แบบนี้สามารถพัฒนาให้สัตว์ทดลองเกิดการดื้อยาที่ปริมาณมอร์ฟีนขนาดสูงๆได้ ในการทดลองทำให้ค่าองศาของการดื้อยาซึ่งหาได้โดยดูค่า AD_{50} เพิ่มขึ้นจากค่า AD_{50} ของหนูปกติประมาณ 20 เท่าในช่วงเวลา 16 วัน (AD_{50} เพิ่มขึ้นจาก 5 มก./กก.น้ำหนักตัว ขึ้นเป็น 100 มก./กก.น้ำหนักตัว)

7. เมื่อศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงระดับ cyclic AMP ในบริเวณส่วนต่างๆของสมองหนู คือ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain cerebellum และ pons + medulla ในระหว่างที่หนูทดลองค่อยๆถูกทำให้เกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้นโดยเทียบกับหนูที่มีค่า AD_{50} 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว พบว่าในบริเวณ cortex มีการลดลงของระดับ cyclic AMP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า AD_{50} 100 มก./กก.น้ำหนักตัว ส่วนในบริเวณ thalamus + hypothalamus ระดับ cyclic AMP จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อค่า AD_{50} 16.6, 33 และ 100 มก./กก.น้ำหนักตัว สำหรับบริเวณ midbrain ระดับ cyclic AMP จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า AD_{50} 100 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP ในบริเวณ cerebellum จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า AD_{50} 16.6, 33 และ 100 มก./กก.น้ำหนักตัว และบริเวณส่วนของ pons + medulla จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP เมื่อค่า AD_{50} เพิ่มขึ้นจาก 8.7 จนถึง 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

8. เมื่อเปรียบเทียบระดับ cyclic AMP บริเวณส่วนต่างๆในสมองของหนูที่ได้รับมอร์ฟีนแบบเรื้อรังกับการได้รับมอร์ฟีนแบบเฉียบพลัน พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับ cyclic AMP ในบริเวณส่วนของ cortex, thalamus + hypothalamus, midbrain และ cerebellum ของหนูทั้ง 2 พวก เมื่อปริมาณมอร์ฟีนที่ให้ 5, 8.7, 16.6 และ 33 มก./กก.น้ำหนักตัว แต่การได้รับยาแบบเฉียบพลันจะมีผลต่อระดับ cyclic AMP ในบริเวณ pons + medulla อย่างมาก พบว่าเมื่อให้ปริมาณมอร์ฟีนแบบเฉียบพลัน 5 และ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว ระดับ cyclic AMP จะสูงกว่าหนูที่ได้รับยาแบบเรื้อรัง 5 และ 8.7 มก./กก.น้ำหนักตัว

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อหนูถูกทำให้ดื้อยาเพิ่มขึ้น ระดับ cyclic AMP ในหนูที่ได้รับยาแบบเฉียบพลันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ดื้อยา

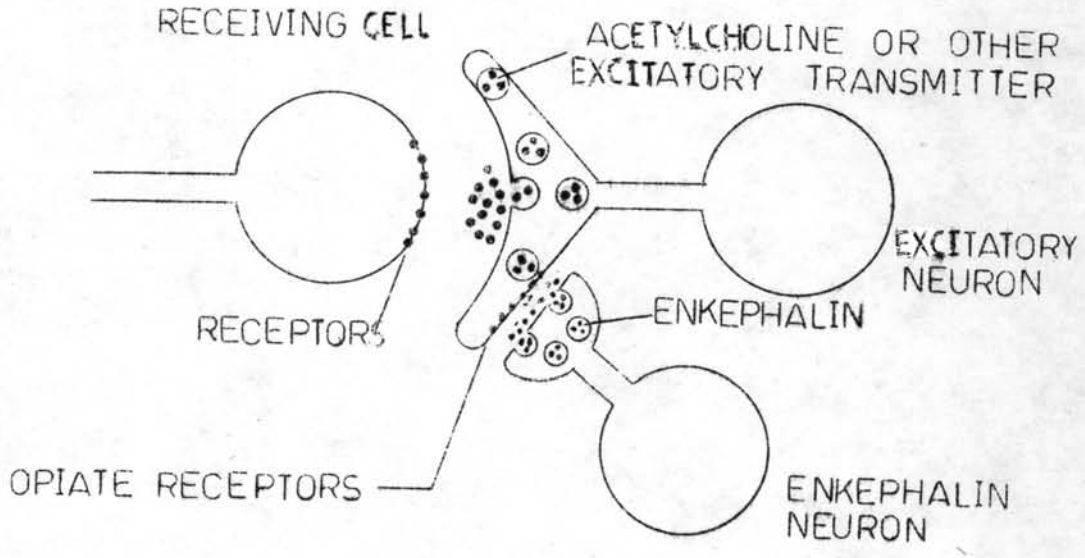
ข้อเสนอแนะ

ถึงแม้ว่าจะมีการวิจัยอย่างกว้างขวางถึงกลไกการทำงานของยาเสพติดต่อระบบประสาทส่วนกลาง แต่ผลจากการทดลองยังไม่สามารถตั้งข้อสรุปได้ ทั้งนี้เพราะเซลล์ในระบบประสาทมีการทำงานที่ซับซ้อนมากและในแต่ละส่วนของสมองยังมีปริมาณ neurotransmitter ต่างกัน อย่างไรก็ตามการวิจัยยาเสพติดก็ยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพราะยาเสพติดทำให้เกิดปัญหาแก่ทั่วโลกทั้งนี้เนื่องจากการที่ยังไม่เข้าใจถึงกลไกการทำงานของยาเสพติดในการทำให้เกิดการดื้อยาและการเกิดภาวะพึ่งยาทางกาย

การทดลองนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นและยังไม่มีผู้ใดได้รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP ที่องศาการดื้อยาต่างๆกัน ดังนั้นการที่จะอธิบายถึงกลไกการทำงานของยาเสพติดในแง่ของ cyclic AMP ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของพัฒนาการดื้อยามอร์ฟีนที่ระดับองศาของการดื้อยาต่างๆกัน ต่อระดับเอ็นไซม์ adenylate cyclase และเอ็นไซม์ phosphodiesterase ซึ่งเอ็นไซม์ทั้ง 2 เกี่ยวข้องกับ cyclic AMP เพื่อที่จะนำมาอธิบายถึงการลดลงของระดับ cyclic AMP และควรจะศึกษาว่าเมื่อหนูทดลองมีการงดเสพเกิดขึ้นที่ระดับองศาของการดื้อยาต่างๆกันจะมีผลต่อระดับ cyclic AMP หรือไม่ นอกจากนี้ควรศึกษาเกี่ยวกับปริมาณ receptor ของฝิ่นในบริเวณส่วนต่างๆของสมองของหนูที่พัฒนาการดื้อยาที่องศาของการดื้อยาต่างๆกัน เพื่อที่จะศึกษาว่าผลของการดื้อยาอาจเกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงจำนวน receptor ของฝิ่น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ cyclic AMP ด้วย

ในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมาได้มีการสะกัดสารชนิดหนึ่งออกจากสมอง และให้ชื่อสารตัวนี้ว่า enkephalin (Simantov และ Snyder , 1976) ซึ่งพบได้

ทั่วไปในสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สิ่งที่น่าสนใจคือสารตัวนี้มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางเภสัชที่เหมือนกับมอร์ฟีน (Teschemacher และคณะ, 1975) มี regional distribution และ subcellular distribution ที่เหมือนกับมอร์ฟีน ซึ่งต่อมา Snyder (1977) ได้เสนอ model ของการดื้อยามอร์ฟีน โดยมี enkephalin เป็นตัวเกี่ยวข้องด้วย ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 Model ของการดื้อยามอร์ฟีน (Snyder , 1977)

เชื่อว่า enkephalin ทำหน้าที่เป็น inhibitory neurotransmitter ในภาวะปกติ enkephalin ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ประสาทชนิดหนึ่งที่ชื่อว่า enkephalin neuron จะจับกับ receptor ของฝิ่น แล้วมีผลทำให้การหลั่งของ excitatory transmitter ลดลง ดังนั้น impulse ที่มาสู่ receiving cell น้อยลง จึงเกิดการระงับปวดที่จุดหนึ่ง ถ้าฉีดอนุพันธ์ของฝิ่นเข้าไป receptor ของฝิ่นจะจับทั้งฝิ่นและ enkephalin ทำให้ผลการยับยั้งมากขึ้นจึงเพิ่มการระงับปวดให้มากกว่าเดิม แต่เมื่อฉีดฝิ่นเข้าไปบ่อยๆ เกิดการดื้อยา

ขึ้นเนื่องจากมี negative feed back จาก receptor ของฝิ่น ผลทำให้การหลั่ง enkephalin ลดลง ในภาวะนี้ต้องการฝิ่นเพิ่มขึ้นเพื่อให้การระงับปวดเท่าเดิม นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่า enkephalin เกี่ยวข้องกับ cyclic AMP ดังนั้น model นี้น่าจะสนับสนุนว่ามีการลดลงของ cyclic AMP เกิดขึ้นในเมื่อมีการดื้อยา