ขั้นตอนที่ 3 การนำผลที่ได้จาก immunoblotting ไปประเมินระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor

นำแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มไปวิเคราะห์หาระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA)

5. การศึกษาระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กด้วยวิธี autoradiography

เนื้อเยื่อสมองซึ่งประกอบด้วยสมองส่วน hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area ถูก incubate กับ [^{3}H]dizocilpine maleate ([^{3}H]MK-801) เป็นเวลา นาที โดยใช้ 60 MK-801 ในการวัดระดับของ non-specific NMDA receptor binding จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อทั้งหมดไปวางเทียบกับแถบ tritium มาตรฐานบน Hyperfilm เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อครบตามจำนวนเวลา autoradiographs จะถูกนำไปวิเคราะห์หาระดับของ NMDA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA)

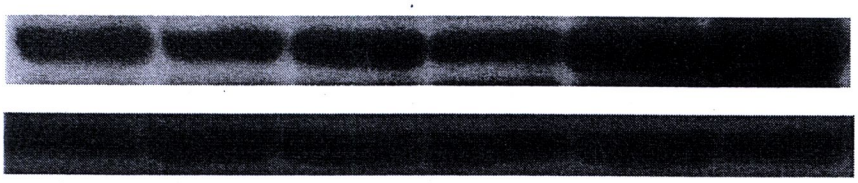
13.2.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มต่างๆที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี immunoblotting และ autoradiography ถูกนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม โดยใช้สถิติ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$)

ผลการศึกษา

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ D2 receptor ในสมองหนูขาว

ระดับของ D2 receptor ที่แสดงออกในเนื้อสมองของหนูขาวเล็ก จะแสดงเป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 51 กิโลดัลตัน (KDa) (รูปที่ 1) จากผลการศึกษาพบว่าระดับของ D2 receptor ในเนื้อสมองหนูขาวเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคตินมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับนิโคติน และเมื่อหนูที่อยู่ในภาวะเลียนแบบการขาดนิโคตินได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดต่างๆ (125, 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ระดับของ D2 receptor กลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นกลับมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามผลการเปลี่ยนแปลงของระดับ D2 receptor นี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



รูปที่ 1 แถบโปรตีนระดับ **D2 receptor** ที่น้ำหนักโมเลกุล **51 kDa** จากสมองหนูขาวเล็กโดยวิธี **immunoblotting. C** คือ หนูขาวเล็กกลุ่มควบคุม, **N** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยน้ำเกลือ, **M** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่กลุ่มได้รับ **nicotine** ตามด้วย **macamylamine, V125** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, **V250** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, **V500** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

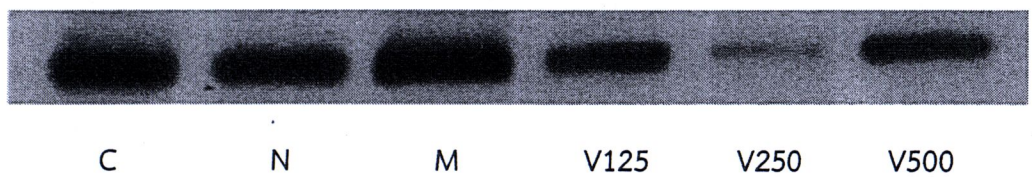
ตารางที่ 1 ระดับของ D2 receptor ในสมองหนูขาวเล็ก จากการศึกษาโดยวิธี immunoblotting

หนูขาวเล็ก	ปริมาณความเข้มของแถบโปรตีน (N = 3)
กลุ่มควบคุม	213.99 ± 17.17
กลุ่มที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน	201.13 ± 17.18
กลุ่มที่ได้รับ mecamylamine	205.45 ± 16.32
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	208.38 ± 9.03
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	218.69 ± 1.34
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	223.81 ± 7.24

หมายเหตุ ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็ก

เนื้อสมองหนูขาวเล็กเฉพาะส่วน membrane fraction ถูกนำมาหาระดับ NMDA receptor ซึ่งแสดงเป็นแถบบนแผ่นฟิล์มโดยมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนประมาณ 120 กิโลดัลตัน (KDa) (รูปที่ 2) จากผลการศึกษาพบว่าระดับของ NMDA receptor ในสมองจากหนูขาวเล็กในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มของการลดลงในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวหลังจากเกิดภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว แต่การลดลงของระดับ NMDA receptor ไม่ขึ้นกับขนาดของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่หนูขาวเล็กได้รับ (ตารางที่ 2)



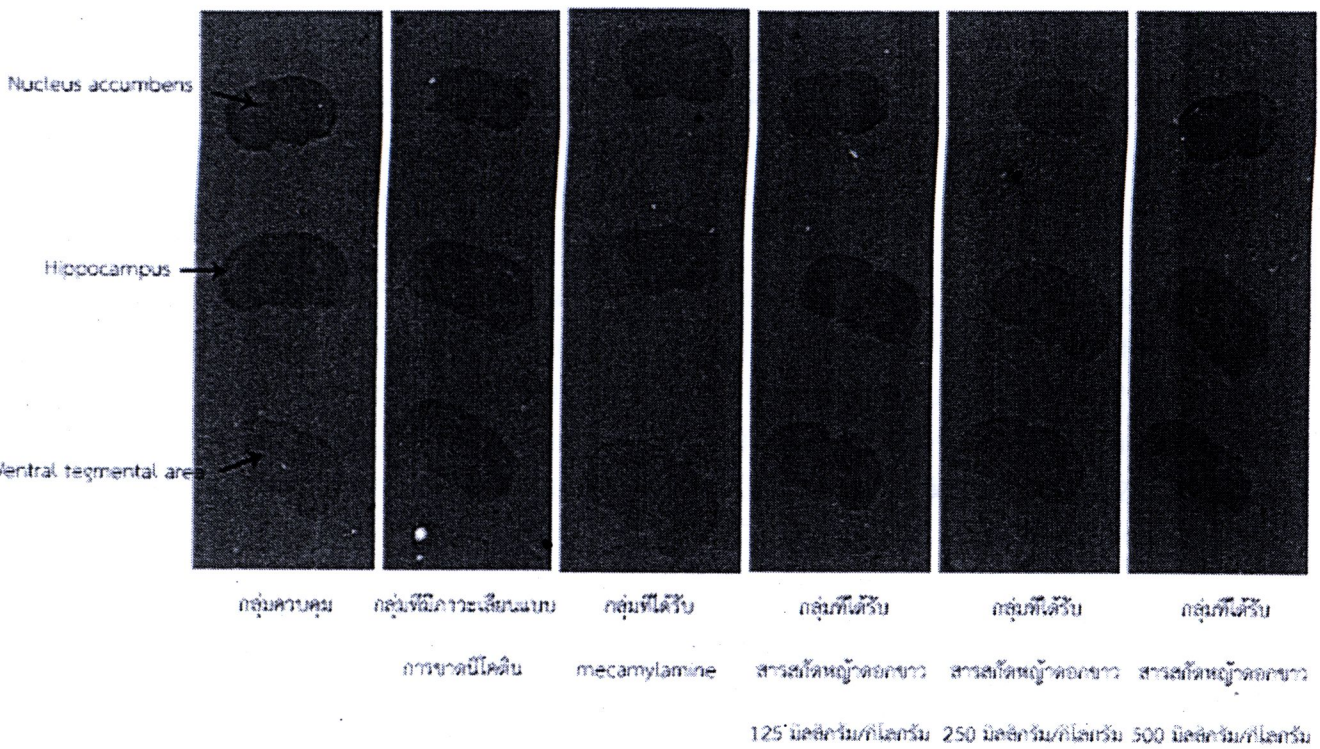
รูปที่ 2 แถบโปรตีนระดับ **NMDA receptor** ที่น้ำหนักโมเลกุล **120 kDa** จากสมองหนูขาวเล็กโดยวิธี **immunoblotting. C** คือ หนูขาวเล็กกลุ่มควบคุม, **N** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยน้ำเกลือ, **M** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่กลุ่มได้รับ **nicotine** ตามด้วย **macamylamine, V125** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, **V250** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, **V500** คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ **nicotine** ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ตารางที่ 2 ระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็ก จากการศึกษาโดยวิธี immunoblotting

หนูขาวเล็ก	ปริมาณความเข้มของแถบโปรตีน (N = 4)
กลุ่มควบคุม	168.09 ± **51.89**
กลุ่มที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน	175.25 ± 20.72
กลุ่มที่ได้รับ mecamylamine	174.34 ± 37.31
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	127.90 ± 54.55
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	100.53 ± 46.65
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	139.27 ± 25.05

หมายเหตุ ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เนื่องจากระดับของ NMDA receptor ในเนื้อสมองหนูขาวเล็กมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับระดับของ D2 receptor ดังนั้นชิ้นเนื้อสมองหนูขาวเล็กจึงถูกนำไปหาระดับ NMDA receptor โดยวิธี autoradiography ในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการติดนิโคติน ผลที่ได้แสดงเป็น autoradiograph ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 Autoradiograph แสดงระดับ NMDA receptor จากสมองหนูขาวเล็กในกลุ่มต่างๆ