ปวดและอักเสบ (Latha et al., 1998; Iwalewa et al., 2003; Mazumder et al., 2003) และมีฤทธิ์ระงับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Gupta et al.,2003) และเซลล์มะเร็ง (Kuo et al., 2003) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวเป็นผลจากการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยกลไกการออกฤทธิ์ที่จะนำมาใช้อธิบายผลดังกล่าวยังไม่ทราบแน่ชัด สำหรับการศึกษาฤทธิ์ในการรักษาการติดบุหรี่ในคนพบการศึกษาไม่มากนัก ซึ่งจากการศึกษาประสิทธิภาพในการรักษาบุหรี่ในประชากรที่ติดบุหรี่จำนวนหนึ่งในประเทศไทยในจังหวัดสุพรรณบุรี (นริศรา แย้มทรัพย์, 2541) และเชียงราย (ศักดิ์วิชา ไชสวัสดิ์ และมนัชยา มรรคอนันตโชติ, 2539) พบว่าชาชงหญ้าดอกขาวสามารถลดอัตราการสูบบุหรี่ โดยทำให้เกิดการชาลิ้น ทำให้ไม่อยากสูบบุหรี่ เหม็นกลิ่นบุหรี่ สูบแล้วเกิดความรู้สึกอยากอาเจียน และเนื่องจากหญ้าดอกขาวเป็นพืชที่พบเห็นโดยทั่วไป จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะนำหญ้าดอกขาวมาศึกษากลไกในการออกฤทธิ์โดยเฉพาะกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานและปริมาณของ NMDA receptor และด้วยเหตุที่การติดบุหรี่เกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของ dopamine receptor และ NMDA receptor ในสมอง (Cano-Cebrián et al., 2003; Kosowski and Liljequist, 2004) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาถึงผลของสารสกัดของหญ้าดอกขาวที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ dopamine receptor และNMDA receptor ในสมองของสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดภาวะติดนิโคติน เพื่อใช้เป็นแนวทางประยุกต์ในการอธิบายถึงกลไกและประสิทธิภาพของหญ้าดอกขาวในการรักษาการติดบุหรี่ในคนต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหญ้าดอกขาว

นำส่วนใบและต้นของหญ้าดอกขาวแห้งมาทำการลดขนาดลง อบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 ^{o}C จากนั้นนำพืชแห้งของหญ้าดอกขาวมาทำการสกัดสารโดยใช้ซอกเลท (soxhlet apparatus) และมีเมธานอลเป็นตัวทำละลาย ใช้ระยะเวลาในการสกัดเป็นเวลา 8 ชม สารละลายที่ได้จะถูกทำให้แห้งในสภาวะลดความดันเพื่อเอาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดออก สารสกัด (crude extract) ในขั้นตอนนี้พร้อมที่จะนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป สารในความเข้มข้นต่างๆสำหรับการทดลองในขั้นถัดไปสามารถเตรียมได้โดยชั่งสารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมมาละลายในน้ำเกลือให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาวเล็ก (mice) เพศผู้อายุ 1 เดือน ถูกเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง โดยให้สัมผัสกับแสงสว่างและความมืดสลับกัน ทุก 12 ชั่วโมง ซึ่งหนูขาวเล็กจะได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด การทำให้หนูขาวเล็กติดนิโคตินจะทำโดยฉีดสารละลายนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าใต้ผิวหนังวันละ 4 ครั้งห่างกัน 4 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ 8.00 น. เป็นเวลา 14 วัน ในการทดลองหนูขาวจะถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่

- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือ 0.9% เป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับน้ำเกลือ 0.9% โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม
- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับน้ำเกลือ 0.9% โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน
- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 125 กิโลกรัม/มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่ทดลองกลุ่ม 1

- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 250 กิโลกรัม/มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่ทดลองกลุ่ม 2
- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 500 กิโลกรัม/มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่ทดลองกลุ่ม 3

3. การเตรียมสมองของสัตว์ทดลอง

หลังจากเสร็จสิ้นการเตรียมสัตว์ทดลอง สมองหนูขาวเล็กทั้งหมดในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยสมองหนูขาวเล็ก 4 ตัวถูกนำไปปั่น (homogenize) รวมกับ phosphate buffer โดยใช้ homogenizer แล้วจึงนำสิ่งที่ได้จากการปั่นหรือ homogenate ไปเก็บที่อุณหภูมิ $-20^{\circ}C$ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาด้วยวิธี immunoblotting ส่วนสมองหนูขาวเล็ก 3 ตัวที่เหลือ จะถูกนำมาตัดเป็นแผ่นบาง (sectioned) ให้มีความหนา 10 μm โดยใช้ cryostat microtome ที่อุณหภูมิประมาณ $-20^{\circ}C$ และแผ่นเนื้อเยื่อสมองที่ได้ซึ่งประกอบด้วยสมองส่วน hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area ถูกทำให้แห้งบนแผ่น slide แล้วเพื่อใช้ในการศึกษาระดับของ NMDA receptor ด้วยวิธี autoradiography

4. การศึกษาระดับของ dopamine 2 (D2) receptor และ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กด้วยวิธี immunoblotting (Western blot)

<u>ขั้นตอนที่ 1 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของเบรดฟอร์ด (Bradford essay)</u>

นำ homogenate ที่ได้จากข้อ 3 มาทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1: 20 แล้วเติม Bradford reagents ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีเพื่อให้ปฏิกริยาสมบูรณ์ ได้สารละลายมีสี แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (microplate spectrophotometer) และทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนใช้ standard curve จากโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน

<u>ขั้นตอนที่ 2 การแยกโปรตีนด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ immunoblotting ด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับ receptors</u>

Homogenate ถูกนำมาผสมกับ Tris buffers สำหรับเตรียมทำการแยกโปรตีน โดย Tris buffers ประกอบด้วย 50 mMris Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% v/v Tween 20, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) และ 10% protease inhibitor cocktail แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาปั่นแยก (centrifugation) ที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที และเก็บสารส่วนด้านบนซึ่งเป็น membraned proteins ไปผสมกับ elelctrophoresis marker และนำตัวอย่างไปต้มให้เดือดเพื่อสลายโครงสร้างโปรตีน จากนั้นนำตัวอย่างไปทำการแยกโปรตีนโมเลกุลด้วย SDS-PAGE โปรตีนที่ถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลจะถูกนำไปไว้ใน polyvinylidine fluoride membrane (PVDF) และนำ PVDF blot ที่ได้ไปแช่ในสารละลาย 5% albumin เพื่อป้องกัน non-specific binding จากนั้นแช่ PVDF blot ในสารละลาย buffer ที่มี primary monoclonal antibody ต่อ dopamine 2 receptor หรือ NMDA glutamate receptor อัตราส่วน 1:1000 ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เป็นเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง แล้วจึงนำ PVDF blot ไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน secondary antibody ซึ่งจับกับสารสำหรับการวัดผลด้วย chemiluminescent reagent (ECL) บนแผ่นฟิล์ม