การวัดการหลั่งสารสื่อประสาทพวกกรดอะมิโนในกลุ่มศูนย์ประสาทเวสติบูลาร์ในหนูขาว โดยวิธีไมโครไดอะไลซิสและรงคเลขความดันสูง

นางสาว พรนรินทร์ กิตติโสภณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๓๖

ISBN 974-583-393-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018979

I17979903

MEASUREMENT OF AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS IN VESTIBULAR NUCLEUS IN ALBINO RAT BY MICRODIALYSIS AND HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Miss Pornnarin Kittisophon

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-393-2

Thesis Title	Measurement of Amino Acid Neurotransmitters in Vestibular Nucleus of the Albino Rat by Microdialysis and High Pressure Liquid Chromatography
By	Miss Pornnarin Kittisophon
Inter-Department	Physiology
Thesis Advisor	Associate Professor Pavich Tongroach, Ph. D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph. D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Professor M.R. Puttipongse Varavudhi, Ph. D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Pavich Tongroach, Ph. D.)

..... Member

(Associate Professor Ratree Sudsuang, Ph. D.)

..... Member

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph. D.)

..... Member

(Assistant Professor Choogiart Sucanthapree, Ph. D)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พรนรินทร์ กิตติโสภณ : การวัดการหลั่งสารสื่อประสาทพวกกรดอะมิโนในกลุ่มศูนย์ประสาทเวสติบูลาร์ในหนูขาวโดยวิธีไมโครไดอะไลซิสและรงคเลขความดันสูง (MEASUREMENT OF AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS IN VESTIBULAR NUCLEUS IN ALBINO RAT BY MICRODIALYSIS AND HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ภาวิช ทองโรจน์, 108 หน้า. ISBN 974-583-393-2

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทของใยประสาทขาเข้าเวสติบูลาร์ โดยการใช้เทคนิคไมโครไดอะไลซิส และใช้ HPLC โดยจะศึกษาผลของการกระตุ้นและการทำลายเส้นประสาทเวสติบูลาร์ รวมทั้งผลของการกระตุ้นด้วยโปแตสเซียมปริมาณสูงที่มีต่อปริมาณการหลั่งของกรดอะมิโน [aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), serine (Ser), glutamine (Gln), glycine (Gly), taurine (Tau), alanine (Ala) และ γ-aminobutyric acid (GABA)] บริเวณเวสติบูลาร์นิวเคลียส

ผลการวิจัยพบว่า การกระตุ้นเส้นประสาทขาเข้าเวสติบูลารด้วยกระแสไฟฟ้า ทำให้ปริมาณการหลั่งของ Asp และ Glu เพิ่มขึ้นจากระดับปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่การเพิ่มการหลั่งของกรดอะมิโนชนิดอื่นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับระดับปกติ ในหนูขาวที่ทำลายเส้นประสาทเวสติบูลาร์ 1 ข้างทันทีในขณะเก็บสารตัวอย่างพบว่า ระดับของ Asp Glu Tau และ Ala สูงขึ้นเล็กน้อยก่อนลดลง ส่วนในหนูที่เส้นประสาทถูกทำลายแล้ว 3 วัน สังเกตพบความผิดปกติของการทรงตัวและการเคลื่อนไหว และพบว่าระดับ ของ Glu Gln Ala และ Tau ในเวสติบูลาร์นิวเคลียสของข้างที่ถูกทำลายเส้นประสาท ลดลงต่ำกว่าข้างตรงข้ามอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าในหนูที่เส้นประสาทถูกทำลาย การกระตุ้นปลายประสาทด้วยสารละลายโปแตสเซียมปริมาณสูง (100 มิลลิโมลาร์) จะพบว่าการเพิ่มการหลั่งของกรดอะมิโนเกือบทุกชนิดลดลง ยกเว้น Gly โดยที่ Glu มีเปอร์เซนต์ลดลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับในหนูปกติ ส่วนในหนูขาวที่ทำลายเส้นประสาทเวสติบูลาร์แล้ว 7 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับกรดอะมิโนทุกชนิดในเวสติบูลาร์นิวเคลียสทั้งสองข้าง อย่างไรก็ตามระดับของ Glu ยังคงลดต่ำลงในขณะที่ Asp มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และยังคงสังเกตพบความผิดปกติของการทรงตัวและการเคลื่อนไหว

จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปว่า glutamate ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นของเส้นใยประสาทขาเข้าเวสติบูลาร์ ซึ่งหลังจากที่มีการทำลายเส้นประสาทเวสติบูลาร์ จะเกิดการเสียสมดุลของปริมาณการหลั่งของสารสื่อประสาท ซึ่งส่งผลให้สมดุลของการทรงตัวและการเคลื่อนไหวของร่างกายเสียไป แต่อย่างไรก็ตามจะมีกลไกการปรับตัวชดเชยจากส่วนอื่น เพื่อปรับการทำงานของระบบเวสติบูลาร์ให้กลับคืนสู่ภาวะปกติ

ภาควิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต พรนรินทร์ กิตติโสภณ

สาขาวิชา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

##C348925 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEYWORD : AMINO ACID NEUROTRANSMITTER / VESTIBULAR NUCLEUS / ALBINO RAT / MICRODIALYSIS / HPLC

PORNNARIN KITTISOPHON : MEASUREMENT OF AMINO ACID NEUROTRANSMITTER IN VESTIBULAR NUCLEUS IN ALBINO RAT BY MICRODIALYSIS AND HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PAVICH TONGROACH, Ph.D. 108 pp. ISBN 974-583-393-2

The present study was performed in an attempt to identify and quantify amino acids which act as the afferent vestibular transmitter by using microdialysis technique and HPLC. Effect of electrical stimulation and lesion of vestibular nerve including effect of high potassium stimulation on amino acids release (aspartic acid, Asp; glutamic acid, Glu; serine, Ser; glutamine, Gln; glycine, Gly; taurine, Tau; alanine, Ala; γ-aminobutyric acid, GABA) were investigated.

It was found that electrical stimulation of vestibular nerve produced a significant increase of release of Asp and Glu at $p < 0.05$ while no significant increase in efflux of the others was observed. In acute lesioned rats, slightly initial increase was observed in the case of Asp, Glu, Ala and Tau content with subsequent decrease found gradually following prolong sample collection. In 3 days post lesioned rats, it was found that the rats showed abnormal equilibrium and ataxic movement and there was a marked reduction in Glu, Gln, Ala and Tau levels in vestibular nuclei of the lesioned side compared to those of the contralateral side ($p<0.05$). In addition, it was found that after stimulating the vestibular nerve terminal with high potassium (100 mM) solution, the potassium evoked release of almost all of amino acids except glycine in lesioned rats was lower than in normal rats and the greatest decrease was observed in Glu release. In 7 days post lesioned rats, there were no significantly different in all amino acids release between lesioned and contralateral sides. However, there was also a slight trend for mean Glu levels to be decreased, while mean Asp showed a slight increasing trend and also found abnormal equilibrium and ataxic movement.

These results suggest that the excitatory amino, glutamate, acts as vestibular primary afferent transmitter. Lesioning this nerve causes imbalance in neurotransmitter release which produces an abnormal equilibrium and ataxic movement, however, compensatory mechanism from other parts will play an impotant role in vestibular compensation.

ภาควิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต พรนริยนาร์ กิตติโสภณ

สาขาวิชา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Pavich Tongroach for their kindly advice, guidance, frank keen interest and constant encouragement throughout the preparation of this thesis.

I am also deeply grateful to Professor M.R. Puttipongse Varavudhi, Associate Professor Ratree Sudsuang, Associate Professor Boonyong Tantisira and Assistant Professor Choogiart Sucanthapree for their helpful comments and valuable advices on this study.

I would like to thank Assistant Professor Pongsak Kanluan, and the staff of the department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University for provision the facilities used in experimental work.

I am also indebted to all experimental rats for their sacrifice which bring me to succeed in my study.

Apart from my financial support from my parents this study programme has been made possible party by Chulalongkorn University Graduate School for granting my partial financial support (of seven thousand and seven hundred bath) to conduct this research. To them my gratitude goes.

Finally, I am extremely grateful to my parent for their love, encouragement and everything given to me.

TABLE OF CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... IV

ENGLISH ABSTRACT..... V

ACKNOWLEDMENTS..... VI

TABLE OF CONTENTS..... VII

LIST OF TABLES..... X

LIST OF FIGURES..... XI

LIST OF ABBREVIATION..... XIII

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II BACKGROUND INFORMATION..... 4

- The Organization of the Vestibular Complex..... 4
- Physiological Pathway through Vestibular Nuclei.. 6
- Electrophysiological Studies of the Vestibular Nerve on Cells in the Vestibular Nuclei..... 9
- Amino Acids as Possible Vestibular Primary Afferent Transmitter..... 10

III MATERIAL AND METHODS..... 17

- The Experimental Animal..... 17
- Electrophysiological Technique..... 18
  - Recording Technique..... 18

Page

- Electrical Stimulation Technique..... 18
- Electrolytic Lesion Method..... 19
- Microdialysis Experiment..... 21
- Preparation of Microdilysis Probe..... 21
- The CMA/10 Microdialysis Probe..... 21
- The Self Made Dialysis Probe..... 21
- Instrument for Microdialysis..... 25
- Perfusion Method..... 25
- The Perfusion Fluid..... 24
- In Vitro Testing..... 25
- In Vivo Experiment..... 26
- Amino Acids Assay..... 26
- Apparatus..... 26
- Reagent and Chemicals..... 28
- Chromatography..... 30
- Preparation of OPA-Amino Acids..... 30
- Preparation of OPA-Thiol Reagent..... 32
- Standard Solutions..... 32
- Peak Identification and Quantification..... 32
- Histological Study..... 33
- Satistical Analysis..... 33

Page

IV RESULTS..... 34

- Amino Acids Analysis..... 34
- Microdialysis Experiments..... 34
- Spontaneous Release of Endogenous Amino Acids..... 41
- Effect of Electrical Stimulation on Amino Acids Release. 41
- Effect of Nerve Lesion on Amino Acids Release..... 48
- Effect of High- K^+ Solution on Amino Acids Release..... 61

V DISCUSSION..... 85

REFERENCES..... 90

VITA..... 98

LIST OF TABLES

Table Page

1. Coefficient of variation (C.V.) of the peak area..... 35
2. Percentage of recovery of standard amino acids..... 36
3. Level of the spontaneous release of endogenous amino acids from the rat vestibular nuclei..... 47
4. Evoked release of amino acids with electrical stimulation.. 54
5. The release of amino acids from acute lesioned rats..... 60
6. The release of amino acids from 3 days post lesioned rats.. 67
7. The release of amino acids from 7 days post lesioned rats.. 73
8. Evoked release of amino acids with high K^+ in normal rats. 82
9. Evoked release of amino acids with high K^+ in lesioned rats 83
10. Comparison of % increase of amino acids after KCl stimulation in normal and lesioned rats..... 84

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Divisions of the vestibular nucleus, and their output connections to different parts of the brain..... 7
2. The oscillographic record of field potential in vestibular nuclei..... 11
3. Diagrammatic picture of electrophysiological set-up..... 20
4. Schematic description of the CMA/10 microdialysis probe. 22
5. Schematic description of the dialysis cannula..... 23
6. Diagrammatic picture of microdialysis set-up..... 27
7. The diagram of high-performance liquid chromatography. 29
8. o-Phthaldialdehyde (OPA) forms fluorescent derivatives.. 31
9. Chromatogram of OPA-derivatived standard amino acids and perfusate samples..... 37
10. Standard curve of amino acids measurement..... 39
11. Histological section from a successful experiment..... 42
12. Chromatogram of perfusate sample from incorrect placement of the microdialysis..... 43
13. Time course of spontaneous release of amino acids..... 44
14. Chromatogram of perfusate sample of vestibular nuclei in the nerve stimulation experiment..... 49

Figure Page

15. Effect of electrical stimulation of vestibular nerve on amino acids release..... 51
16. Chromatogram of perfusate sample of vestibular nuclei in acute lesion rats..... 55
17. Effect of acute lesion on amino acids release..... 57
18. Chromatogram of perfusate sample of vestibular nuclei in 3 days post lesioned rats..... 62
19. Effect of 3 days post lesion of vestibular nerve on amino acid release..... 64
20. Chromatogram of perfusate sample of vestibular nuclei in 7 days post lesioned rats..... 68
21. Effect of 7 days post lesion of vestibular nerve on amino acids release..... 70
22. Chromatogram of perfusate sample of normal rat vestibular nuclei in high K stimulation experiment 74
23. Chromatogram of perfusate sample of lesioned rat vestibular nuclei in high K stimulation experiment 76
24. Effect of high K stimulation on amino acids release..... 79

ABBREVIATION

ACh	=	acetylcholine
aCSF	=	artificial cerebrospinal fluid
Ala	=	alanine
A-P	=	antero-posterior
APV	=	2-amino-5-phosphovalerate
Asp	=	aspartic acid
cm	=	centimeter
CNQX	=	6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione
CO_2	=	carbondioxide
C.V.	=	coefficeint of variation
D	=	depth
DαAA	=	D-α amino adipic acid
DC	=	direct current
EAA	=	excitatory amino acid
EOM	=	extraocular motor nuclei
EPSP	=	excitatory postsynaptic potential
Fig.	=	figure
GABA	=	γ-aminobutyric acid
GDEE	=	glutamic acid diethylester
Gln	=	glutamine
Glu	=	glutamic acid
Gly	=	glycine
HPLC	=	high pressure liquid chromatography
hrs.	=	hours
Hz	=	hertz
I.D.	=	internal diameter

IVN	=	inferior vestibular nucleus
KA	=	kainic acid
KCl	=	potassium chloride
kg	=	kilogram
kΩ	=	kiloohms
LVN	=	lateral vestibular nucleus
LVST	=	lateral vestibulospinal tract
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
$MgSO_4$	=	magnesium sulphate
min	=	minute
ml	=	milliliter
MLF	=	medial longitudinal fasiculi
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
ms	=	millisecond
MVN	=	medial vestibular nucleus
MVST	=	medial vestibulospinal tract
n	=	number
NaCl	=	sodium chloride
NMDA	=	N-methy-D-aspatic acid
$NaHCO_3$	=	sodium hydrogen carbonate
NaH_2PO_4	=	sodium dihydrogen phosphate
Na_2HPO_4	=	disodium hydrogen phosphate
NE	=	norepinephrine
nmol	=	nanomole

O_2	=	oxygen
O.D.	=	outer diameter
OPA	=	o-phthaldialdehyde
p	=	probability
pmol	=	picomole
S.E.M.	=	standard error of the mean
Ser	=	serine
SVN	=	superior vestibular nucleus
Tau	=	taurine
V/V	=	volume by volume
VST	=	vestibulospinal tract
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
µmol	=	micromole
µsec	=	microsecond
%	=	percent
^oC	=	degree celcius