

ผลของภาวะพร่องซีโร โด닌ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตัวรับเอ็นเอ็มดีเอในวิถีประสาท
ไครเจมินอลของหนูขาวซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยการอักเสบของเชื้อหุ้มสมองคุดรา

นายมนตรี มณีภาค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECT OF HYPOSEROTONIN ON NMDA RECEPTOR
PHOSPHORYLATION IN RAT TRIGEMINAL PATHWAY
INDUCED BY DURAL INFLAMMATION**

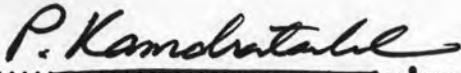
Mr. Montree Maneepak

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University**


490902

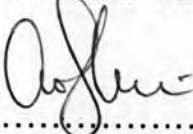
Thesis Title EFFECT OF HYPOSEROTONIN ON NMDA
RECEPTOR PHOSPHORYLATION IN RAT
TRIGEMINAL PATHWAY INDUCED BY DURAL
INFLAMMATION
By Mr. Montree Maneepak
Field of Study Medical Science
Thesis Advisor Professor Anan Srikiatkachorn, M.D.
Thesis Co-advisor Supang Maneesri LeGrand, Ph.D.


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

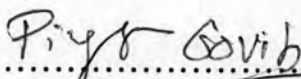

.....Dean of the Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratkul, M.D.)


THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Professor Anan Srikiatkachorn, M.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Supang Maneesri LeGrand, Ph.D.)


.....Member
(Professor Piyarat Govitrapong, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D.)

มนตรี มณีภาค: ผลของภาวะพร่องซีโรโตนินต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตัวรับเอ็นเอ็มดีเอในวิถีประสาท ไตรเจมินอลของหนูขาวซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองดูรา (EFFECT OF HYPOSEROTONIN ON NMDA RECEPTOR PHOSPHORYLATION IN RAT TRIGEMINAL PATHWAY INDUCED BY DURAL INFLAMMATION) อ. ที่ปรึกษา: ศ.นพ. อนันต์ ศรีเกียรติขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม: อ.ดร.ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองค์, 82 หน้า.

วัตถุประสงค์คือศึกษาผลของภาวะพร่องซีโร โตนินต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตัวรับเอ็นเอ็มดีเอและการแสดงออกของตัวรับเอ็นเอ็มดีเอในไตรเจมินอลนิวเคลียสคอคาลิส และต่อการรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอล ซึ่งถูกกระตุ้นโดยการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองดูรา

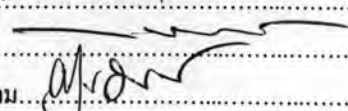
หนูวิศตาร์เพศผู้ถูกแบ่งเป็นกลุ่มพร่องซีโร โตนินและกลุ่มปกติ ซีโรโตนินถูกทำให้พร่องโดยการฉีดพาราคลอโรฟีนิลอะลานีนซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ทริปโตเฟนไฮดรอกซีเลสเข้าช่องท้อง 3 วันก่อนการทดลอง สารสื่ออักเสบผสมซึ่งประกอบไปด้วยสารสื่ออักเสบชนิดต่างๆ หรือน้ำไขสันหลังเทียมซึ่งถูกทำให้เป็นกรดได้ถูกหยดลงบนผิวเยื่อหุ้มสมองดูราเป็นเวลาสามสิบนาที เพื่อกระตุ้นการรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอล น้ำไขสันหลังจะถูกหยดลงบนผิวเยื่อหุ้มสมองดูราในกลุ่มควบคุม หลังจากการกระตุ้นเป็นเวลาสามสิบนาทีและสองชั่วโมง ทำการแยกก้านสมองและน้ำไขสันหลังเพื่อศึกษาการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งซีรีน-896 ของตัวรับเอ็นเอ็มดีเอหน่วยย่อยเอ็นอาร์หนึ่ง (พีเอ็นอาร์หนึ่ง) การแสดงออกของตัวรับเอ็นเอ็มดีเอหน่วยย่อยเอ็นอาร์หนึ่ง และการแสดงออกของฟอสโคยิวีเอ็มมิวโนฮิสโตเคมีสทรี การรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอลถูกกำหนดโดยจำนวนเซลล์ประสาทที่แสดงฟอสโคในไตรเจมินอลนิวเคลียสคอคาลิส

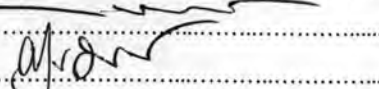
ผลการศึกษาแสดงว่าการหยดสารสื่ออักเสบผสมเท่านั้นทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตัวรับเอ็นอาร์หนึ่งและกระตุ้นการรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอล จำนวนเซลล์ที่แสดงพีเอ็นอาร์หนึ่งและเซลล์ที่แสดงฟอสโคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ได้รับสารสื่ออักเสบผสมเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม การเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตัวรับเอ็นอาร์หนึ่ง และการรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอลซึ่งถูกกระตุ้น โดยการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองดูราเพิ่มมากขึ้นในภาวะพร่องซีโร โตนิน จำนวนเซลล์ที่แสดงพีเอ็นอาร์หนึ่งและเซลล์ที่แสดงฟอสโคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูพร่องซีโร โตนินเทียบกับหนูปกติโดยเฉพาะหนูกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสื่ออักเสบผสม ทั้งการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองและภาวะพร่องซีโร โตนินไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของตัวรับเอ็นอาร์หนึ่ง จำนวนเซลล์ที่แสดงเอ็นอาร์หนึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในหนูทุกกลุ่ม

มีความสัมพันธ์ระหว่างการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตัวรับเอ็นอาร์หนึ่งและการรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอล โดยพบความสัมพันธ์ที่แข็งแรงระหว่างจำนวนเซลล์ที่แสดงพีเอ็นอาร์หนึ่งและเซลล์ที่แสดงฟอสโคในไตรเจมินอลนิวเคลียสคอคาลิส ในหนูปกติสามารถแสดงเป็นสมการเส้นตรง $y = 0.520x$ ($r^2 = 0.957$, $P < .001$) อย่างไรก็ตามความชันของสมการเพิ่มขึ้นในหนูซึ่งพร่องซีโร โตนินและแสดงได้เป็น $y = 0.706x$ ($r^2 = 0.941$, $P < .001$)

กล่าวโดยสรุป กระบวนการรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอลซึ่งเหนี่ยวนำโดยการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองเพิ่มมากขึ้นในภาวะพร่องซีโร โตนิน กลไกการเพิ่มขึ้นของการรับรู้ความเจ็บปวดนี้อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตัวรับเอ็นอาร์หนึ่ง โดยไม่เกี่ยวกับการแสดงออกของตัวรับเอ็นอาร์หนึ่ง การศึกษานี้สนับสนุนบทบาทของซีโร โตนินในการควบคุมการรับรู้ความเจ็บปวดในวิถีไตรเจมินอล

สาขาวิชา..วิทยาศาสตร์การแพทย์..... ลายมือชื่อนิสิต..... ^{หน้า} ^{หน้าภาค}

ปีการศึกษา..2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

4774809430: MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: HYPOSEROTONIN/ NMDA RECEPTOR/ PHOSPHORYLATION/ TRIGEMINAL PATHWAY/ DURAL INFLAMMATION/ NR1/ FOS/ MIGRAINE

MONTREE MANEPAK: EFFECT OF HYPOSEROTONIN ON NMDA RECEPTOR PHOSPHORYLATION IN RAT TRIGEMINAL PATHWAY INDUCED BY DURAL INFLAMMATION. THESIS ADVISOR: PROF. ANAN SRIKIATKHACHORN, M.D. THESIS CO-ADVISOR: SUPANG MANEESRI LEGRAND, Ph.D. 82 pp.

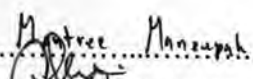
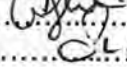
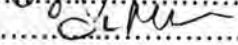
This study aims to investigate the effect of serotonin depletion on the phosphorylation of NMDA receptor and NMDA receptor expression in trigeminal nucleus caudalis (TNC), and on trigeminal nociception evoked by dural inflammation.

Male Wistar rats were separated into low serotonin and normal serotonin groups. Serotonin was depleted by peritoneal injection with para-chlorophenylalanine, a tryptophan hydroxylase inhibitor, 3 days prior to the experiment. To induce trigeminal nociception, inflammatory soup (IS) containing a mixture of inflammatory mediators (histamine, serotonin, bradykinin, each at 1 mM, and 0.1 mM prostaglandin E₂, pH 5.5) or low-pH artificial cerebrospinal fluid (low-pH CSF; pH 4.7) was applied on exposed dural surface for thirty minutes. In control groups, artificial cerebrospinal fluid was applied instead. Thirty minutes and two hours after induction, the brainstem and cervical cord were removed for serine-896 phosphorylated NMDA receptor NR1 subunit (pNR1), NMDA receptor NR1 subunit (NR1), and Fos immunohistochemical studies. Trigeminal nociception was determined by the number of Fos-immunoreactive neurons in the TNC.

The results showed that dural application of IS, not low-pH CSF, led to the activation of trigeminal nociceptive system as well as phosphorylation of NR1 receptor. The numbers of pNR1- and Fos-immunoreactive cells were significantly greater in rats receiving IS than those of the controls. Dural inflammation-induced NR1 receptor phosphorylation as well as trigeminal nociception was enhanced in the low serotonin condition. The numbers of pNR1- and Fos-immunoreactive cells were significantly greater in serotonin-depleted rats than those of the normal serotonin rats, especially in IS group. Neither meningeal inflammation nor serotonin depletion altered NR1 receptor expression. The number of NR1-immunoreactive cells was not significantly different in all groups.

There was a relationship between NR1 receptor phosphorylation and trigeminal nociception. Strong correlation between numbers of pNR1- and Fos-immunoreactive cells in the TNC was demonstrated. In normal serotonin rats, this correlation was able to represent by the linear equation of $y = 0.520x$ ($r^2 = 0.957$, $P < .001$). However, the slope of equation was elevated in low serotonin rats and the equation became $y = 0.706x$ ($r^2 = 0.941$, $P < .001$).

In conclusion, the process of meningeal inflammation induced trigeminal nociception is enhanced in the low serotonin condition. The mechanism of nociceptive facilitation may involve the increase in NR1 receptor phosphorylation, not the increase in NR1 expression. This study further supports the role of serotonin in the control of trigeminal nociception.

Field of Study..Medical Science....	Student's signature.....	
Academic year..2006.....	Advisor's signature.....	
	Co-advisor's signature.....	

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Prof. Dr. Anan Srikiatkachorn, for his valuable guidance, and supervision which have enabled me to carry out my study successfully. I would like to express my deepest appreciation to my co-advisor, Dr. Supang Maneesri LeGrand, who devoted herself to train, suggest, and help me throughout my experiment. I am also deeply indebted to my teachers for their financial support.

I am very grateful to the members of the thesis committee for their magnificent comments and the correction of this thesis. I would like to thank Mr. Preecha and Ms. Mookda who kindly provided chemicals and facilities used in immunohistochemistry. I am also very grateful to Mr. Sophon Suwansophon, who scanned a lot of slides for me. My thankful is extended to Mr. Veera Supornsilpchai and Mr. Maroot Kaewwong for their neuroscience technique training.

I would like to thank my family and friends for their support, love, and encouragement.

This study was supported by The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadphiseksomphot Endowment Fund), Chulalongkorn University.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEWS.....	3
Migraine	3
Inflammatory mediators relevant to migraine pathophysiology.....	4
A. Histamine	4
B. Serotonin	4
C. Bradykinin.....	6
D. Prostaglandin E ₂	6
E. Proton	7
Model of trigeminovascular activation.....	7
Dural inflammation model of migraine.....	9
NMDA receptor	10
A. NMDA receptor and pain	11
B. NMDA receptor modification	12
C. NR1 receptor subunit phosphorylation	13
Fos	14
Serotonin and pain modulatory system	15
Serotonin depletion and migraine.....	16
Serotonin depletion and chronic daily headache (CDH)	18
III MATERIALS AND METHODS.....	19
Materials.....	19
A. Chemicals and Biochemicals	19
B. Materials.....	20

TABLE OF CONTENTS (Continue)

	PAGE
Experimental design.....	21
Methods.....	24
A. Animal preparation.....	24
B. Induction of serotonin depletion.....	24
C. Surgical preparation.....	24
D. Chemical stimulation.....	26
E. Perfusion.....	26
F. Cryosectioning	27
G. Immunohistochemistry.....	29
1.) Fos immunohistochemistry	29
2.) NR1 and pNR1 ser896 immunohistochemistry.....	29
H. Quantification of Fos, NR1, and pNR1 ser896 immunostaining.....	30
I. Statistical analysis	30
IV RESULTS	32
Effect of dural stimulation on trigeminal nociception in normal rats....	32
A. Distribution and pattern staining.....	32
B. Quantitative analysis.....	34
Effect of dural stimulation on NR1 receptor expression in normal rats.....	36
A. Distribution and pattern staining.....	36
B. Quantitative analysis.....	38
Effect of dural stimulation on NR1 receptor phosphorylation in normal rats	40
A. Distribution and pattern staining.....	40
B. Quantitative analysis.....	42
Effect of serotonin depletion on trigeminal nociception induced by dural stimulation	45
A. Comparison between serotonin-depleted groups.....	45
B. Comparison between serotonin-depleted and normal groups.....	45

TABLE OF CONTENTS (Continue)

	PAGE
Effect of serotonin depletion on NR1 receptor expression.....	49
Effect of serotonin depletion on NR1 receptor phosphorylation induced by dural stimulation.....	52
A. Comparison between serotonin-depleted groups.....	52
B. Comparison between serotonin-depleted and normal groups.....	52
Relationship between NR1 receptor phosphorylation and trigeminal nociception.....	59
V DISCUSSION.....	61
Effect of dural stimulation on trigeminal nociception in normal rats....	61
Effect of dural stimulation on NR1 receptor expression in normal rats.....	62
Effect of dural stimulation on NR1 receptor phosphorylation in normal rats.....	64
Effect of serotonin depletion on trigeminal nociception induced by dural stimulation.....	65
Effect of serotonin depletion on NR1 receptor expression.....	66
Effect of serotonin depletion on NR1 receptor phosphorylation induced by dural stimulation.....	66
Relationship between NR1 receptor phosphorylation and trigeminal nociception.....	68
Further study.....	70
VI CONCLUSIONS.....	71
REFERENCES.....	73
BIOGRAPHY.....	82

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. Number of Fos-ir cells in TNC of normal rats with dural stimulation by IS or low-pH CSF compared to control.....	35
2. Number of NR1-ir cells in TNC of normal rats with dural stimulation by IS compared to controls at 30 minutes and 2 hours	39
3. Number of pNR1-ir cells in TNC of normal rats with dural stimulation by IS or low-pH CSF compared to controls at 30 minutes and 2 hours	43
4. Number of Fos-ir cells in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal 5-HT rats	47
5. Number of NR1-ir cells in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal rats at 30 minutes and 2 hours	50
6. Number of pNR1-immunoreactive cells in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal rats at 30 minutes and 2 hours.....	54

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1.	Experimental design	21
2.	More detailed experimental design	23
3.	Tracheotomy and femoral vein cannulation	25
4.	Craniotomy position on rat skull	25
5.	Open skull operation	26
6.	A cannula inserted to heart for perfusion	28
7.	Brain stem and spinal cord block	28
8.	Aperio image scope program	31
9.	Distribution of Fos-ir cells in dorsal horn of TNC	33
10.	Cellular pattern staining of Fos	33
11.	Bar graph showing the number of Fos-ir cells in TNC of normal rats with dural stimulation by IS or low-pH CSF compared to control	35
12.	Distribution of NR1-ir cells in dorsal horn of TNC	37
13.	Cellular pattern staining of NR1	37
14.	Bar graph showing the number of NR1-ir cells in TNC of normal rats with dural stimulation by IS compared to controls at 30 minutes and 2 hours	39
15.	Distribution of pNR1-ir cells in dorsal horn of TNC	41
16.	Cellular pattern staining of pNR1	41
17.	Bar graph showing the number of pNR1-ir cells in TNC of normal rats with dural stimulation by IS or low-pH CSF compared to controls at 30 minutes and 2 hours	43
18.	Bar graph showing the percentage of NR1 phosphorylation in TNC of normal rats with dural stimulation by IS or low-pH CSF compared to controls at 30 minutes and 2 hours	44
19.	Bar graph showing the number of Fos-ir cells in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal rats	47
20.	Fos-immunoreactive cells in dorsal horn of TNC	48
21.	Bar graph showing the number of NR1-ir cells in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal rats at 2 hours	50

LIST OF FIGURES (Continue)

FIGURE		PAGE
22	NR1-ir cells in dorsal horn of TNC	51
23	Bar graph showing the number of pNR1-immunoreactive cells in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal rats at 30 minutes.....	55
24	Bar graph showing the number of pNR1-immunoreactive cells in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal rats at 2 hours.....	56
25.	Bar graph showing the percentage of NR1 phosphorylation in TNC with and without dural stimulation of 5-HT depleted rats compared to normal rats at 30 minutes and 2 hours.....	57
26	pNR1-ir cells in dorsal horn of TNC	58
27.	Correlation between number of pNR1- and Fos-ir cells in normal serotonin and serotonin-depleted group.....	60

LIST OF ABBREVIATIONS

5-HT	5-hydroxy tryptamine, serotonin
°C	Degree Celsius
μL	Microlitre
AMPA	α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-isoxazol-4-propionic acid
ANOVA	Analysis of variance
C1	Cervical segment 1 of spinal cord
C2	Cervical segment 2 of spinal cord
CAP	Capsaicin
CDH	Chronic daily headache
CFA	Complete Freund's adjuvant
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CNS	Central nervous system
COX	Cyclooxygenase
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-response-element binding protein
CSD	Cortical spreading depression
CSF	artificial cerebrospinal fluid
DAB	Diaminobenzidine
ER	Endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
g	Gram
GPCR	G protein-coupled receptor
H	Hour
HRP	Horseradish peroxidase
IEG	Immediate-early gene
IHC	Immunohistochemistry
i.p.	Intraperitoneal
ir	Immunoreactive
IS	Inflammatory soup
i.v.	Intravenous
kg	Kilogram
Low-pH CSF	Low-pH phosphate-buffered artificial cerebrospinal fluid

LIST OF ABBREVIATIONS (Continue)

LRG	Late-response gene
LSD	Least significant difference
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Milligram
Min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimetre
NKA	Neurokinin A
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NR1	NMDA receptor subunit 1
NRM	Nucleus raphe magnus
OCT	Optimal cutting temperature
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCPA	para-chlorophenylalanine
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
pNR1	Serine-896 phosphorylated NMDA receptor NR1 subunit
RVM	Rostral ventromedial medulla
RXR	Arginine-X-Arginine motif
Ser	Serine
SP	Substance P
SRE	Serum-response element
TNC	Trigeminal nucleus caudalis
VR1	Vanilloid receptor