กรดอะมิโนที่อาจเป็นสารสื่อประสาทของเส้นประสาทเวสติบูลาร์

นางสาว วรรณภา วารุณี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-872-4

012513

I 10298733

AMINO ACIDS AS POSSIBLE VESTIBULAR PRIMARY AFFERENT TRANSMITTER

MISS WONNAPHA WARUNEE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1987

ISBN 974-567-872-4

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn Unviersity.

Thesis Title	Amino Acids as Possible Vestibular Primary Afferent Transmitter
Name	Miss Wonnapha Warunee
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

(Assistant Professor Pongsak Kanluan)

.....Member

(Associate Professor Pavich Tongroach,Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Ratree Sudsuang,Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Surachai Unchern)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ กรดอะมิโนที่อาจเป็นสารสื่อประสาทของเส้นประสาทเวสติบูลาร์

ชื่อนิสิต นางสาว วรรณภา วารุณี

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวิช ทองโรจน์

ภาควิชา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2529

บทคัดย่อ

Vestibular system เป็นระบบสำคัญยิ่งระบบหนึ่งที่ควบคุมเกี่ยวกับการทรงตัว ประสานงานการเคลื่อนไหวของศีรษะ และตา โดยมีการติดต่อกับสมองส่วนอื่น ๆ ได้มีการศึกษา ความสัมพันธ์ของระบบนี้กับสมองส่วนอื่น ๆ โดยวิธีการทางกายวิภาคศาสตร์ และการศึกษาถึงกลไกการทำงานของระบบนี้ทางด้านสรีรวิทยาทางไฟฟ้า แต่การศึกษาทางด้านสารเคมีที่เป็นสารสื่อประสาทของระบบนี้ ยังไม่มีผู้ใดศึกษา การทราบถึงรายละเอียดของสารสื่อประสาท จะทำให้เราสามารถเข้าใจถึงการทำงานของระบบนี้ได้ดียิ่งขึ้น และจะยังประโยชน์ในการคิดค้นทางด้านเภสัชวิทยาอีกด้วย

โดยการใช้วิธี superfusion บริเวณ vestibular nucleus ของหนูขาวด้วยน้ำไขสันหลังเทียม และใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) วิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนที่หลั่งออกมา เมื่อกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและ potassium ปริมาณสูง

จากการศึกษาพบว่า ในหนูขาวที่กระตุ้น vestibular nucleus ด้วยกระแสไฟฟ้าและ potassium ปริมาณสูง (100 mM) ปริมาณการหลั่งของ aspartate และ glutamate เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษานี้สนับสนุนความคิดที่ว่า aspartate และ/หรือ glutamate อาจจะเป็นสารสื่อประสาทของเส้นใยประสาทขาเข้าเวสติบูลาร์

Thesis Title Amino Acids as Possible Vestibular Primary Afferent Transmitter

Name Miss Wonnapha Warunee

Thesis Advisor Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.

Department Physiology

Academic Year 1986

ABSTRACT

The vestibular system plays an important role in the control of posture and equilibrium. The system has been extensively investigated an anatomically and electrophysiologically but until now there has been little evidence concerning the chemical neurotransmitters used in this pathway. A knowledge of neurotransmitters is essential for complete understanding of the function and dysfunction of the vestibular system, and is a prerequistic for the design of novel pharmacological agents with which to combat many neurological disorders.

Here we have used neurochemical approache to identify possible neurotransmitters used by vestibular primary afferents : measurement of endogenous amino acids released in perfusate after high potassium depolarization and electrical stimuli. The vestibular nuclear complex was perfused with artificial cerebro-spinal fluid using a push-pull cannula. The endogenous amino acids release in the perfusate was determined by high- performance liquid chromatography (HPLC) combined

with fluorimetric derivatives.

Both stimulation of vestibular nerve and perfusion with high potassium CSF (100 mM) produced significant increase in glutamate and aspartate contents recovered in the perfusate. This result suggests that glutamate and/or aspartate may be neurotransmitters of the vestibular primary afferents.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Pavich Tongroach, for his kind advice, guidance, keen interest and constant encouragement throughout this study.

I am much thankful to all staff member of the Scientific and Technological Research Equipment Centre (STREC), Chulalongkorn University, and those of the Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,Chulalongkorn University, for providing advice and facilities used in experimental works.

Apart from the financial support from my parents, this study programme has been made possible part by Chulalongkorn University Graduate School for granting my partial financial support, to conduct this research to them, my gratitude goes.

Finally, I would like to extend my appriciation to my parents for their love and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	IV
ENGLISH ABSTRACT.....	V
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VII
TABLE OF CONTENTS.....	VIII
LIST OF TABLES.....	X
LIST OF FIGURES.....	XI
ABBREVIATION.....	XIII
CHAPTER	
1. INTRODUCTION.....	1
2. MATERIAL AND METHODS	
1. Materials.....	9
2. Superfusion method.....	11
3. Electrical stimulation method.....	12
4. Amino acid assays	
4.1 Chromatograph.....	13
4.2 Reagent and Chemicals...	15
4.3 Chromatography.....	16
4.4 Precolumn Derivatization	16
5. Histological study.....	16

Page

3. RESULTS

1. Amino acid analysis :

Preparation of standard curve 20

2. Perfusion experiments..... 20

3. Spontaneous release of

endogenous amino acids..... 21

4. Effect of high K^+ concentration

on amino acids release..... 26

5. Effect of Ca^{2+} on amino acid

release..... 32

6. Effect of electrical stimulation

on amino acids release..... 32

7. The study of stimulating electrode

position..... 40

4. DISCUSSION..... 49

REFERENCES..... 53

VITA..... 68

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Coefficient of variation (C.V.) of the peak area	23
2.	Levels of the spontaneous release of vestibular nucleus	31
3.	Evoked release of amino acids with high K^+ 50 mM	35
4.	Evoked release of amino acids with high K^+ 100 mM	38
5.	The Ca^{2+} dependency of K^+-evoked release of amino acids	39
6.	Evoked release of amino acids with electrical stimulation	43

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Diagrammatic representation of the relationship between the vestibular ganglia and central fibers projecting to parts of the vestibular nuclei complex.....	3
2.	The oscillographic record of field potential in vestibular nuclei complex.....	5
3.	Schematic description of the superfusion push-pull cannula.....	10
4.	Schematic illustration of the stimulation recording.....	14
5.	Diagrammatic representation of high performance liquid chromatography.....	17
6.	o-Phthalaldehyde (OPA) forms fluorescent derivatives.....	19
7.	Chromatogram of standard amino acids...	21
8.	Standard curve of amino acids measurement.....	22
9.	Chromatogram of the perfusate sample from the rat vestibular nucleus.....	24
10.	Histological section from a successful experiment.....	25

Figure Page

11. Chromatogram of the perfusate sample from incorrect placement of the push-pull cannula..... 27

12. Histological section of the cannula tip located outside of the vestibular nuclei..... 28

13. The spontaneous release of endogenous amino acids..... 29

14. Effect of high concentration of K^+ on the release of endogenous amino acids..... 33

15. Effect of high concentration of K^+ with Ca^{2+} -dependent and K^+ with Ca^{2+} -free on the release of endogenous amino acids..... 36

16. Effect of electrical stimulation of vestibular nerve on amino acids release..... 41

17. Histological section of electrical stimulation site..... 44

18. Effect of electrical stimulation at difference point of the vestibular nerve on the release of glutamate and aspartate..... 45

ABBREVIATION

Ala	=	alanine
Asp	=	aspartic acid
cm	=	centrimetre
CSF	=	cerebrospinal fluid
°C	=	degree celcius
EDTA	=	ethyldiaminotetraacetic acid
Fig.	=	figure
GABA	=	gamma-aminobutyric acid
g	=	gram
Glu	=	glutamic acid
$Glu\text{-}NH_2$	=	glutamine
Gly	=	glycine
HPLC	=	high-performance liquid chromatography
I.D.	=	internal diameter
kg	=	kilogram
M	=	Molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute
mM	=	millimolar
mm	=	millimetre
nm	=	nanometre
nmol	=	nanomole
P	=	probability

pmol	=	picomole
Psi	=	Pound per square inch
S.E.	=	standard error
Ser	=	serine
Tau	=	taurine
uA	=	microampere
ul	=	microlitre
um	=	micrometre
v/v	=	volume by volume
%	=	percent