

บทบาทของ ไนตริกออกไซด์ และ เซโรโทนิน ในการปรับการอักเสบของหลอดเลือดสมอง  
จากปรากฏการณ์คอร์ติคัล สเปรตติ้ง ดีเพรสชัน

นางสาว จันทิมา ปัทมานนท์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1052-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20470769

**ROLE OF NITRIC OXIDE AND SEROTONIN IN MODULATION OF  
CORTICAL SPREADING DEPRESSION-EVOKED NEUROGENIC  
VASCULAR INFLAMMATION**



Miss Juntima Pattamanont

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Physiology  
Inter-department of Physiology

Graduate school

Chulalongkorn University

Academic year 2002

ISBN 974-17-1052-6

|                   |  |
|-------------------|--|
| Thesis Title      | ROLE OF NITRIC OXIDE AND SEROTONIN IN<br>MODULATION OF CORTICAL SPREADING<br>DEPRESSION-EVOKED NEUROGENIC<br>VASCULAR INFLAMMATION |
| By                | Miss Juntima Pattamanont   |
| Field of Study    | Physiology   |
| Thesis Advisor    | Associate Professor Anan Srikiatkachorn, M.D.  |
| Thesis Co-advisor | Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.   |


---


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

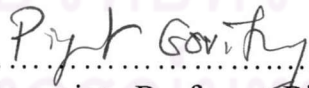
..... Dean of Graduate School  
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

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

  
..... Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.)

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

  
..... Member  
(Associate Professor Yupin Sungvarinta, Ph.D.)

จันทิมา บัทยาพนธ์: บทบาทของ ไนตริกออกไซด์ และ เซโรโทนิน ในการปรับการอักเสบของหลอดเลือดสมองจากปรากฏการณ์คอร์ติคัล สปรดดิ้ง ดีเพรสชั่น (ROLE OF NITRIC OXIDE AND SEROTONIN IN MODULATION OF CORTICAL SPREADING DEPRESSION-EVOKED NEUROGENIC VASCULAR INFLAMMATION) อ. ที่ปรึกษา: รศ. นพ. อนันต์ ศรีเกียรติขจร, อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช; 129 หน้า ISBN 974-17-1052-6

ปรากฏการณ์คอร์ติคัล สปรดดิ้ง ดีเพรสชั่น (Cortical spreading depression; CSD) เป็นปรากฏการณ์ทางสรีรวิทยาที่สัมพันธ์กับพยาธิกำเนิดของอาการผิดปกติ ที่เกิดขึ้นในระยะก่อนที่จะเกิดอาการปวดศีรษะไมเกรน อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างปรากฏการณ์ CSD และการเกิดอาการปวดศีรษะตลอดจน การเปลี่ยนแปลงในอัตราการไหลเวียนเลือดของสมองนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวินิจฉัยบทบาทของ ไนตริกออกไซด์ (NO) และ เซโรโทนิน (5-HT) ต่อกลไกการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดสมอง ซึ่งถูกกระตุ้นโดยปรากฏการณ์ CSD

หนูพันธุ์สัตว์เพศผู้ ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ CSD โดยการวางผลึกโพแทสเซียม คลอไรด์ ขนาด 3 มิลลิกรัม ลงบนผิวสมอง ในขณะที่กลุ่มควบคุม จะวางผลึกโซเดียม คลอไรด์ ลงไปแทน หนูในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย (กลุ่มละ 5 ตัว) ซึ่งจะได้รับน้ำเกลือ, L-NAME และ นาราทร립แทน ทั้งนี้ L-NAME และ นาราทร립แทน เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไนตริก ออกไซด์ซินเทส (NOS) และสารกระตุ้นตัวรับเซโรโทนินชนิด 1B ตามลำดับ ทำการวัดอัตราการไหลเวียนเลือดเฉพาะที่ของเปลือกสมองด้วยวิธี laser Doppler flowmetry (LDF) และวัดการเปลี่ยนแปลงขนาดของหลอดเลือดแดงรอง โดยใช้เทคนิคของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ผลการศึกษาพบว่า การวางโพแทสเซียม คลอไรด์ลงบนผิวสมอง ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดเฉพาะที่ในลักษณะที่เป็นวงจรร และการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบลักษณะของการขยายตัวและหดตัวของหลอดเลือดเป็นวงจรร ซึ่งสัมพันธ์กับผลที่วัดได้จาก LDF การให้ L-NAME สามารถลดการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดเฉพาะที่ ได้เช่นเดียวกับผลการขยายตัวของหลอดเลือด และพบว่าผลของการลดการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดของสมอง ขึ้นอยู่กับขนาดยาของสารยับยั้งเอนไซม์ NOS ที่ได้รับ ผลการศึกษายังพบว่า ปรากฏการณ์ CSD กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดของสมองโดยการกระตุ้น NO ในทางตรงกันข้าม การให้นาราทร립แทนที่ขนาด 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดของสมองจากปรากฏการณ์ CSD ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการกระตุ้นตัวรับชนิดนี้บนหลอดเลือดอาจจะมีบทบาทไม่มาก ในกระบวนการนี้

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ NOS ชนิดนิวโรนอล อาจจะเป็นบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดของสมองจากปรากฏการณ์ CSD ข้อมูลนี้ น่าจะทำให้การอธิบายกลไกทางสรีรวิทยาในเรื่องของการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเวียนเลือดของสมอง ซึ่งพบในระยะที่เกิดอาการปวดศีรษะไมเกรนชัดเจนมากขึ้น

หลักสูตร.....บัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโท  
สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา  
ปีการศึกษา.....2545

ลายมือชื่อนิสิต.....จันทิมา บัทยาพนธ์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....[ลายมือ]  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....[ลายมือ]

##4289657420: MAJOR PHYSIOLOGY

KEYWORD CORTICAL SPREADING DEPRESSION/ NITRIC OXIDE/ SEROTONIN  
 JUNTIMA PATTAMANONT: ROLE OF NITRIC OXIDE AND SEROTONIN IN  
 MODULATION OF CORTICAL SPREADING DEPRESSION-EVOKED  
 NEUROGENIC VASCULAR INFLAMMATION. THESIS ADVISOR: ASSOC.  
 PROF. ANAN SRIKIATKHACHORN, M.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC.  
 PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D. 129 pp. ISBN 974-17-1052-6.

Cortical spreading depression (CSD) is a possible physiological phenomenon underlying aura phase of migraine. However, definite relationship between CSD and the generation of headache as well as changes in cerebrovascular flow is not well understood. This study was conducted to investigate the role of nitric oxide (NO) and serotonin (5-HT) in pathophysiological mechanism of cerebrovascular changes induced by CSD.

Adult male Wistar rats were divided into two main groups, including the control group and the CSD group. CSD was induced by topical application of solid KCl 3 mg on the parietal brain surface where solid NaCl was served as a control. The rats from each group were further divided into three sub-groups (5 rats each) receiving normal saline (NSS), L-NAME and naratriptan-treated group. L-NAME and naratriptan were used as NOS inhibitor and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist, respectively. Regional cerebral blood flow (rCBF) and pial arteriolar diameter were chosen as outcome measures. The rCBF was monitored by the laser Doppler flowmetry (LDF) and pial arteriolar diameter was measured by the fluorescent microscopic technique. The results showed that KCl application induced the repeated pattern of hyperemic cycles. The fluorescent microscope showed the vasodilation-vasoconstriction cycles which its temporal pattern correlated well with the signal from LDF. Administration of L-NAME could minimize the amplitude of hyperemic peaks as well as the maximal vasodilation of hyperemic cycles. The minimizing effect of L-NAME on cerebral hyperemia depended on its dosage. Our findings suggest that CSD evokes cerebral hyperemia via activating NO pathway. On the other hand, administration of naratriptan at the dose of 0.1 mg/kg BW did not decrease cerebral hyperemia evoked by CSD. The data suggest that activation of this class of vascular receptor may play a minor role in this process.

Based on these findings, we conclude that the stimulation of nNOS activity may play a major role in CSD-evoked cerebral hyperemia. This information may further clarify the physiologic mechanism underlying the changes in CBF observe during migraine attack.

Department. Inter-department Physiology Student's signature. Juntima Pattamanont.  
 Field of study. Physiology Advisor's signature. [Signature]  
 Academic year. 2009 Co-advisor's signature. [Signature]

## ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my gratitude and appreciation to my kind advisor, Associate Professor Dr. Anan Srikiatkachorn MD, for his excellent instruction, guidance, encouragement and support during the long working process, which enable me to carry out this study. His kindness will be long remembered.

I would like to express my gratitude to Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj for training me about the laser Doppler flowmetry and fluorescent microscopic technique and helping me to more deeply understand my research. Her tireless and dedicated devotion to my thesis will in my mind forever.

I would like give a very special vote to thank to Miss Supang Maneesri and Miss Chalalai Suwattanasophon for their assistance, cheerfulness and support my mind throughout this study. My thanks also go to all of my friends for their cheerfulness and understanding.

I wish to express my sincere thanks to all my teachers at Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University who are not mentioned here for all their loving helps during the time I was studying.

My appreciations are also devoted to my dear father, sister and aunt for their love, kindness and support my mind throughout this study.

## TABLE OF CONTENT

|                                   | PAGE |
|-----------------------------------|------|
| ABSTRACT (THAI) .....             | iv   |
| ABSTRACT (ENGLISH) .....          | v    |
| ACKNOWLEDGEMENTS .....            | vi   |
| TABLE OF CONTENT .....            | vii  |
| LIST OF TABLES .....              | viii |
| LIST OF FIGURES .....             | ix   |
| LIST OF ABBREVIATIONS .....       | xv   |
| <b>CHAPTER</b>                    |      |
| I.    INTRODUCTION .....          | 1    |
| II.   REVIEW OF LITERATURE .....  | 4    |
| III.  MATERIALS AND METHODS ..... | 56   |
| IV.  RESULTS .....                | 66   |
| V.   DISCUSSION .....             | 93   |
| VI.  CONCLUSION .....             | 102  |
| REFERENCES .....                  | 103  |
| BIOGRAPHY .....                   | 129  |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

### TABLE

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 2.1 | Classification and Characteristics of Migraine<br>According to the Criteria Set by the International<br>Headache Society..... | 9  |
| 2.2 | NOS isoforms.....   | 33 |
| 2.3 | Overview 5-HT recognition sites.....  | 46 |
| 2.4 | 5-HT Receptor Nomenclature .....  | 46 |
| 2.5 | Classification of Serotonin Receptors.....  | 47 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF FIGURES

### FIGURE

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.1  | Scintilling scotoma and digitolingual syndrome .....   | 5  |
| 2.2  | Maps of Scintilling scotoma .....  | 7  |
| 2.3  | Basic features of CSD.....   | 13 |
| 2.4  | Electrophysiological changes during CSD<br>in rat brain .....  | 16 |
| 2.5  | Simplistic sheme of autocatalytic cycle<br>possibly occurring during CSD.....                                  | 17 |
| 2.6  | Blood flow changes during CSD .....  | 17 |
| 2.7  | The releasing of glutamate during CSD.....   | 22 |
| 2.8  | Example trace of changes in cortical D.C.<br>potential and NO electrode current during<br>CSD.....             | 23 |
| 2.9  | Diagram depicting the relationship between<br>pial vessels, the trigeminovascular system and<br>neocortex..... | 25 |
| 2.10 | The trigeminovascular system .....   | 27 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 2.11 | Synthesis of NO from L-arginine.....  | 32 |
| 2.12 | The mechanism of NO releasing triggered<br>by cNOS.....                             | 34 |
| 2.13 | The mechanism of NO releasing triggered<br>by iNOS .....                            | 34 |
| 2.14 | Chemical structure of 5-HT .....  | 42 |
| 2.15 | The biosynthesis and catabolism of serotonin.....                                   | 44 |
| 3.1  | Diagram of experimental animal groups .....   | 58 |
| 3.2  | Diagram of experimental animal groups : Dose-<br>effect relationship of L-NAME..... | 59 |
| 3.3  | The laser Doppler flowmetry study.....  | 61 |
| 3.4  | The intravital fluorescent microscopic study.....                                   | 63 |
| 3.5  | Schematic of arteriole showed the measurement<br>of pial arteriolar diameter .....  | 63 |
| 4.1  | The tracing showing the rCBF changes in NaCl<br>and KCl application group.....      | 67 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 4.2  | The percent change from baseline in rCBF of NaCl and KCl application group.....                                       | 67 |
| 4.3  | The intravital videomicroscope image of pial arteriole before and after KCl application .....                         | 69 |
| 4.4  | The intravital videomicroscope image of pial arteriole before and after NaCl application .....                        | 69 |
| 4.5  | The percent change of pial arteriole diameter from baseline in NaCl and KCl application groups .....                  | 70 |
| 4.6  | The tracing showing the examples of the rCBF changes in NaCl application rats with and without L-NAME treatment.....  | 71 |
| 4.7  | The percent change of rCBF from baseline NaCl application rats with and without L-NAME treatment .....                | 72 |
| 4.8  | The tracing showing the examples of the MABP changes in NaCl application rats with and without L-NAME treatment ..... | 74 |
| 4.9  | The percent change of MABP from baseline NaCl application rats with and without L-NAME treatment .....                | 74 |
| 4.10 | The tracing showing two examples of the   |    |

|   |    |
|---|----|
| rCBF changes in KCl application with<br>L-NAME treatment .....  | 75 |
| 4.11 The percent change of rCBF from baseline<br>in KCl application rats with and without<br>L-NAME treatment .....                 | 76 |
| 4.12 The percent reduction of rCBF from baseline<br>in KCl application rats with and without<br>L-NAME treatment .....              | 76 |
| 4.13 The tracing showing the rCBF changes in KCl<br>application rats with L-NAME treatment:<br>Dose-effect relationship.....        | 78 |
| 4.14 The percent change of rCBF from baseline in KCl<br>application rats with L-NAME treatment:<br>Dose-effect relationship.....    | 79 |
| 4.15 The percent reduction of rCBF from baseline in<br>KCl application rats with L-NAME treatment:<br>Dose-effect relationship..... | 79 |
| 4.16 The effect of L-NAME on CSD-evoked<br>cerebral hyperemia in each rat:<br>Dose-effect relationship.....                         | 80 |

- 4.17 The intravital videomicroscope image of pial arteriole at the maximum peak in the KCl application rats with L-NAME treatment..... 81
- 4.18 The percent change of pial arteriole diameter from baseline in KCl application rats with and without L-NAME treatment ..... 82
- 4.19 The percent reduction of pial arteriole diameter from baseline in KCl application rats with and without L-NAME treatment..... 82
- 4.20 The tracing showing the rCBF changes in NaCl application rats with and without naratriptan treatment..... 83
- 4.21 The percent change of rCBF from baseline in NaCl application rats with and without naratriptan treatment..... 84
- 4.22 The tracing showing the MABP changes in NaCl application rats with and without naratriptan treatment..... 86
- 4.23 The percent change of MABP from baseline in NaCl application rats with and without naratriptan treatment..... 86
- 4.24 The tracing showing the rCBF changes in KCl

|   |    |
|---|----|
| application rats with naratriptan treatment .....   | 87 |
| 4.25 The percent change of rCBF from baseline in KCl<br>application rats with naratriptan treatment .....   | 88 |
| 4.26 The percent reduction of rCBF from baseline in KCl<br>application rats with naratriptan treatment .....  | 88 |
| 4.27 The intravital videomicroscope image of pial<br>arterioles at the maximum vasodilation in each<br>peak in the KCl application with naratriptan-<br>treated group ..... | 89 |
| 4.28 The percent change of pial arteriolar diameter<br>from baseline in KCl application rats with and<br>without naratriptan treatment .....                                | 90 |
| 4.29 The percent reduction of pial arteriolar diameter<br>from baseline in KCl application rats with and<br>without naratriptan treatment .....                             | 90 |

## LIST OF ABBREVIATIONS

|                  |   |
|------------------|---|
| $\mu\text{m}$    | = micrometer                                |
| 5-CT             | = 5-Carboxaminostryptamine                  |
| 5-HIAA           | = 5-Hydroxyindoleacetic acid                |
| 5-HT             | = serotonin                                 |
| 5-HTP            | = 5-Hydroxytryptophan                       |
| BW               | = body weight                               |
| $\text{Ca}^{2+}$ | = calcium ion                               |
| cGMP             | = cyclic guanosine monophosphate            |
| CGRP             | = calcitonin gene-related peptide           |
| CKK              | = cholecystokinin                           |
| $\text{Cl}^-$    | = chloride ion                              |
| cNOS             | = constitutive nitric oxide synthase        |
| CSD              | = cortical spreading depression             |
| CNS              | = central nerverous system                  |
| EEG              | = electroencephalogram                      |
| eNOS             | = endothelial nitric oxide synthase         |
| $\text{H}^+$     | = hydrogen ion                              |
| HPLC             | = high performance lipid chromatography     |
| iNOS             | = inducible nitric oxide synthase           |
| $\text{K}^+$     | = potassium ion                             |
| KCl              | = potassium chloride                        |
| kg               | = kilogram                                  |
| LDF              | = laser Doppler flowmetry                   |
| L-NAME           | = N $\omega$ -Nitro-L-Arginine Methyl Ester |

|                              |   |
|------------------------------|---|
| mCPP                         | = m-Cholorophenylpiperazine                     |
| mg                           | = milligram                                     |
| mm                           | = millimeter                                    |
| mV                           | = millivolt                                     |
| Na <sup>+</sup>              | = sodium ion                                    |
| NaCl                         | = sodium chloride                               |
| NMDA                         | = N-methyl-D-aspartate                          |
| nNOS                         | = neuronal nitric oxide synthase                |
| nNOS-IR                      | = neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive |
| NO                           | = nitric oxide                                  |
| NO <sub>2</sub>              | = nitrogen dioxide                              |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | = nitrite                                       |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | = nitrate                                       |
| NOS                          | = nitric oxide synthase                         |
| NSS                          | = normal saline                                 |
| NTG                          | = nitroglycerine                                |
| pA                           | = picoampere                                    |
| PBS                          | = phosphate buffer saline                       |
| R6G                          | = Rhodamine 6G                                  |
| rCBF                         | = regional cerebral blood flow                  |
| sGC                          | = cyclic guanylate cyclase                      |
| SP                           | = substance P                                   |
| TNC                          | = trigeminal nucleus caudalis                   |
| VIP                          | = vasoactive intestinal polypeptide             |