ตารางที่ 3.1 แสดงผลของ nitroglycerin infusion (8 mg/kg b.w.) ต่อหลอดเลือด pial arterioles บนผิวสมองใหญ่ในกลุ่มควบคุม แสดงผลเป็น per cent of baseline diameter ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที post-infusion

Effect of nitroglycerin (8 mg/kg) infusion on pial arterioles: Control group

Number of Vessel	Per cent changes from baseline diameter			
	5 min	15 min	30 min	60 min
1	25.0	25.0	37.5	25.0
2	13.8	10.3	3.5	3.5
3	17.2	17.2	10.3	10.3
4	8.7	17.4	8.7	8.7
5	28.6	14.3	7.1	7.1
6	26.1	21.7	8.7	8.7
7	17.9	17.9	28.6	21.4
8	11.1	11.1	14.8	18.5
9	47.1	47.1	5.9	5.9
10	28.6	33.3	38.1	23.8
11	35.0	30.0	30.0	30.0
12	0.0	15.0	20.0	20.0
13	25.0	50.0	58.3	50.0
14	14.3	14.3	14.3	9.5
15	16.0	4.0	4.0	4.0
16	33.3	38.1	47.6	47.6
17	28.0	20.0	20.0	20.0
18	13.6	13.6	13.6	4.6
19	11.5	23.1	23.1	23.1
20	20.0	12.0	12.0	12.0
21	16.7	33.3	33.3	25.0
22	4.8	23.8	33.3	23.8
23	62.5	68.8	43.8	43.8
24	4.0	12.0	20.0	12.0
25	10.0	10.0	10.0	6.7
26	23.3	23.5	29.4	41.2
27	12.5	37.5	25.0	25.0
28	21.4	21.4	7.1	7.1
29	19.1	19.1	4.8	4.8
30	0.0	17.7	17.7	17.7
Mean+SE	23.2+4.0	23.4+2.5	21.0+2.6	18.7+2.4

ตารางที่ 3.2 แสดงผลของ nitroglycerin infusion (10 mg/kg b.w.) ต่อการขยายเส้นเลือด pial arterioles บนผิวสมองใหญ่ในกลุ่มควบคุม แสดงผลเป็น per cent of baseline diameter ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที post-infusion

Effect of nitroglycerin (10 mg/kg) infusion on pial arterioles: Control group

Number of Vessel	Per cent changes from baseline diameter			
	5 min	15 min	30 min	60 min
1	17.7	52.9	47.1	47.1
2	36.4	50.0	50.0	77.3
3	32.0	32.0	20.0	20.0
4	71.4	121.4	42.9	42.9
5	85.0	95.0	75.0	60.0
6	46.7	46.7	33.3	33.3
7	0.0	11.1	11.1	22.2
8	6.3	31.3	6.3	0.0
9	12.0	32.0	32.0	40.0
10	16.7	83.3	86.7	83.3
11	60.0	100.0	140.0	120.0
12	33.3	100.0	100.0	83.3
13	31.3	43.8	37.5	37.5
14	36.4	50.0	50.0	54.6
15	53.3	60.0	26.7	20.0
16	84.6	130.8	130.8	107.7
17	28.0	68.0	116.0	84.0
18	6.7	30.0	13.3	0.0
19	25.0	33.3	58.3	25.0
20	0.0	33.3	73.3	60.0
21	38.9	55.6	94.4	55.6
22	86.7	146.7	120.0	100.0
23	0.0	25.0	16.7	8.3
24	33.3	44.4	61.1	27.8
25	79.0	78.9	5.3	5.3
26	7.7	15.4	38.5	38.5
27	9.1	54.6	63.6	63.6
28	45.5	63.6	90.9	54.6
29	4.8	33.3	19.1	9.5
30	16.7	16.7	20.0	16.7
Mean+SE	33.5+5.0	58.0+6.4	56.0+7.1	46.6+6.0

ตารางที่ 3.3 แสดงผลของ nitroglycerin infusion (8 mg/kg b.w.) ต่อหลอดเลือด pial arterioles บนผิวสมอง ในกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment nitroglycerin แสดงผลเป็น per cent of baseline diameter ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที post-infusion

Effect of nitroglycerin (8 mg/kg) infusion on pial arterioles: PCPA-treated group

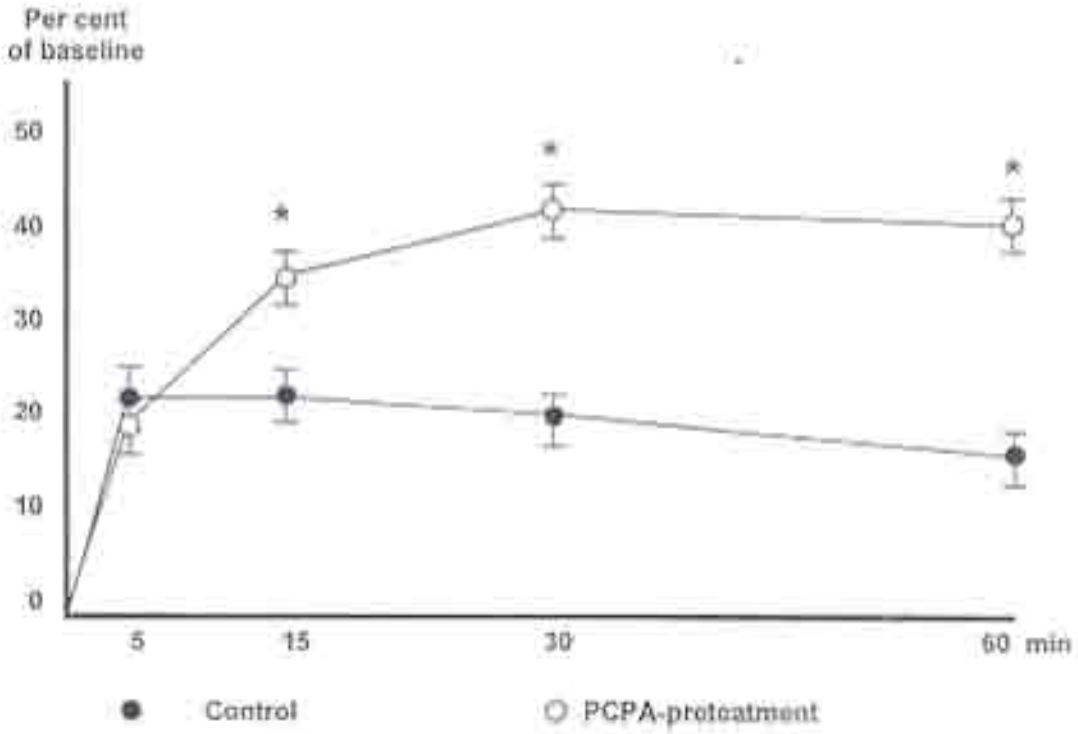
Number of Vessel	Per cent changes from baseline diameter			
	5 min	15 min	30 min	60 min
1	33.3	33.3	40.0	66.7
2	22.2	33.3	33.3	50.0
3	20.8	33.3	58.3	58.3
4	16.7	33.3	53.3	56.7
5	27.8	38.9	38.9	38.9
6	0.0	20.0	40.0	40.0
7	15.8	21.1	47.4	15.8
8	19.1	19.1	19.1	19.1
9	33.3	33.3	66.7	66.7
10	19.1	28.6	28.6	14.3
11	34.6	57.7	73.1	76.9
12	22.2	55.6	55.6	55.6
13	26.7	50.0	60.0	60.0
14	15.8	31.6	31.6	31.6
15	22.2	44.4	55.6	55.6
16	27.8	38.9	38.9	38.9
17	32.0	40.0	32.0	28.0
18	53.3	53.3	60.0	20.0
19	23.3	33.3	26.7	26.7
20	38.9	44.4	38.9	38.9
21	21.7	52.2	47.8	47.8
22	27.3	31.9	31.3	9.1
23	16.7	33.3	44.4	38.9
24	0.0	36.4	36.4	36.4
25	4.6	22.7	45.5	36.4
26	3.3	30.0	30.0	33.3
27	7.1	39.3	39.3	39.3
28	28.6	28.6	28.6	35.7
29	0.0	20.0	20.0	20.0
30	0.0	22.2	55.6	77.8
Mean+SE	20.5+2.4	35.3+2.0	42.6+2.5	41.1+3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงผลของ nitroglycerin infusion (10 mg/kg b.w.) ต่อหลอดเลือด pial arterioles บนผิวสมอง ในกลุ่มที่ให้ PCPA pretreatment nitroglycerin แสดงผลเป็น per cent of baseline diameter ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที post-infusion

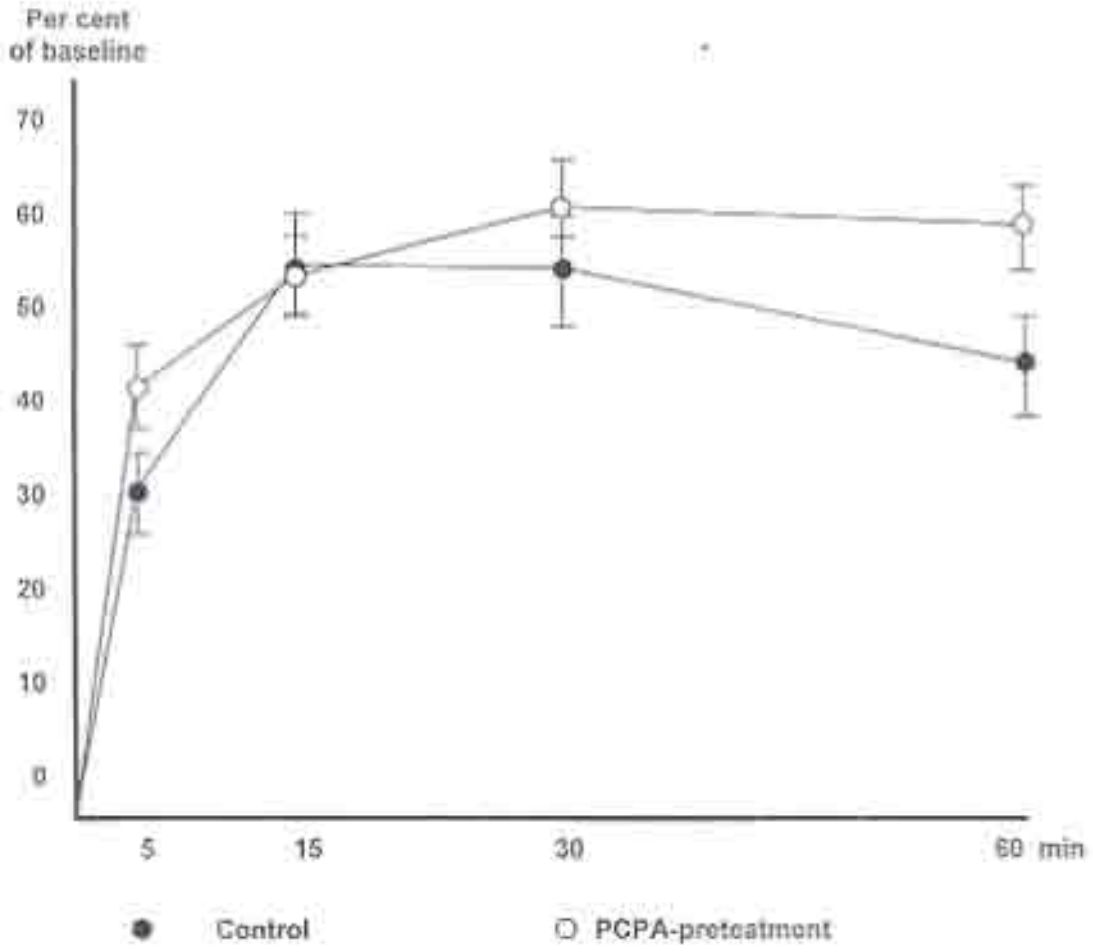
Effect of nitroglycerin (10 mg/kg) infusion on pial arterioles: PCPA-treated group

Number of Vessel	Per cent changes from baseline diameter			
	5 min	15 min	30 min	60 min
1	22.2	33.3	33.3	33.3
2	22.2	22.2	40.7	48.2
3	20.7	34.5	34.5	34.5
4	50.0	93.8	100.0	87.5
5	45.0	80.0	80.0	100.0
6	50.0	53.6	60.7	60.7
7	36.4	39.1	43.5	52.7
8	33.3	46.7	60.0	60.0
9	31.8	40.9	50.0	50.0
10	47.1	76.5	82.4	76.6
11	35.7	42.9	57.1	71.4
12	11.8	29.4	29.4	35.3
13	75.0	81.3	81.3	81.3
14	91.7	108.3	133.3	108.3
15	100.0	113.3	113.3	120.0
16	14.3	14.3	25.0	25.0
17	69.6	69.6	60.9	34.8
18	75.0	81.3	81.3	81.3
19	35.0	40.0	40.0	40.0
20	25.0	54.2	58.3	58.3
21	12.5	37.5	56.3	68.8
22	36.4	36.4	36.4	40.9
23	83.3	83.3	108.3	83.3
24	44.4	44.4	33.3	22.2
25	77.8	88.9	94.4	100.0
26	27.8	27.8	38.9	38.9
27	86.7	100.0	100.0	106.7
28	28.0	28.0	28.0	24.0
29	20.0	35.0	50.0	50.0
30	21.4	50.0	50.0	35.7
Mean+SE	44.1+4.8	56.2+5.1	62.2+5.3	61.0+5.3

ภาพที่ 3.1 เปรียบเทียบการตอบสนองของหลอดเลือด pial microvessels หลังการให้ยา nitroglycerin (8 mg/kg b.w.) ที่เวลา 5, 15, 30 และ 60 นาที ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment และกลุ่มควบคุม แสดงผลเป็นร้อยละของเส้นฐานกลางขณะพัก (% of baseline) ผลการศึกษาพบว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับ PCPA pretreatment จะมี prolonged vasodilatation การตอบสนองต่อ nitric oxide donating agent อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (*P<0.01)



ภาพที่ 3.2 เปรียบเทียบการตอบสนองของหลอดเลือด pial microvessels หลังการให้ยา nitroglycerin (10 mg/kg b.w.) ที่เวลา 5, 15, 30 และ 60 นาที ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment และกลุ่มควบคุม แสดงผลเป็นร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก (% of baseline) ผลการศึกษาพบว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับ PCPA pretreatment จะมี prolonged vasodilatation การตอบสนองต่อ nitric oxide donating agent อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (*P<0.01)



การศึกษาที่ 4

ศึกษาผลของ nitric oxide ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดสมอง

เป็นการศึกษาผลของ nitric oxide ต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือดสมอง โดยศึกษาในโครงสร้างระดับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ทั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับออร์แกเนลของเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เอนโดธีเลียม ในการศึกษานี้ใช้ nitroglycerin ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น nitric oxide เมื่อให้เข้าสู่ร่างกาย โดยเปรียบเทียบระหว่างสัตว์ทดลองที่มีภาวะ hyposerotonin กับกลุ่มควบคุม

วิธีการทดลอง

การทดลองนี้ใช้หนูพันธุ์ Wister ไม่จำกัดเพศ แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 7 ตัว ได้แก่ กลุ่ม hyposerotonin และกลุ่มควบคุม เตรียมให้สัตว์ทดลองมีภาวะ hyposerotonin โดยฉีด para-chlorophenylalanine (PCPA) ซึ่งมีฤทธิ์เป็น tryptophan hydroxylase inhibitor ขนาด 300 mg/kg b.w. เข้าช่องท้อง จากนั้นเลี้ยงสัตว์ทดลองต่ออีก 3 วัน เพื่อให้สารสื่อประสาท serotonin ที่มีอยู่ถูกใช้ให้หมดไป จากนั้นจึงเตรียมการทดลองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองของ pial microvessel ต่อสารที่เป็น nitric oxide donor สำหรับในกลุ่มทดลองฉีด normal saline ในปริมาตรเท่ากัน

การเตรียมสัตว์ทดลอง

เมื่อครบระยะเวลา 3 วันหลังจากได้ PCPA pretreatment นำสัตว์ทดลองมาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ ultrastructure ของหลอดเลือดต่อการให้ nitric oxide โดยฉีด nitroglycerin ในขนาด 8 หรือ 10 mg/kg b.w. เข้าทางหลอดเลือดดำ โดยใช้เครื่อง infusion pump โดยให้อาทั้งหมดภายใน 5 นาที 1 ชั่วโมงหลังจาก nitroglycerin infusion เตรียมการวมวิธี perfusion โดยทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลองตั้งแต่ระดับช่องท้องขึ้นถึงทรวงอก เจาะให้เข็มแทงผ่านตั้งแต่ส่วนยอด (apex) ของหัวใจผ่านหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และสอดท่อยางที่ต่อเข้ากับเครื่อง perfusion ทำการ perfuse ด้วย phosphate buffer saline (pH 7.4) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และตามด้วยกระบวนการ fixative ซึ่งใช้ 4% paraformaldehyde (pH 7.4) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองแข็ง จากนั้นนำมาผ่าตัดเปิดกะโหลกศีรษะ แยกผ่ากะโหลกศีรษะออก ตัดแยกเนื้อสมองจากส่วนสมองใหญ่ (cerebral cortex) โดยแบ่งเป็นชิ้นเนื้อรูปลูกบาศก์มีความยาวด้านละ 1 มิลลิเมตร นำเนื้อสมองที่แยกได้มาเตรียมเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน สำหรับในกลุ่มควบคุมใช้ normal saline ฉีดแทนยา nitroglycerin ในการศึกษาขั้นต้นนี้ใช้กลุ่มทดลอง 5 ตัวและกลุ่มควบคุม 2 ตัว

การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

เตรียมชิ้นเนื้อสมองและหลอดเลือดที่ต้องการศึกษาให้อยู่สภาพที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope) โดยผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ทำการ fix เนื้อเยื่อโดยแช่ชิ้นเนื้อใน 3% glutaraldehyde ในสารละลาย cacodylate buffer
2. หลังจากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย sucrose ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที
3. นำมาทำการ fix ซ้ำโดยแช่ในสารละลาย 1% osmic acid
4. ทำให้เนื้อเยื่อปราศจากน้ำ (dehydrate) โดยทำการ alcohol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

5. นำชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากน้ำแล้วมาฝัง (embedded) ลงในแท่งพลาสติก (epoxy resin)
6. นำเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกเรซินมาตัดเป็น ultrathin section ซึ่งมีความหนาระหว่าง 70-80 ไมโครเมตร วางเนื้อเยื่อที่ตัดไว้บนตะแกรงทองแดง (copper grid) ขนาด 200 mesh
7. นำเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (JEM 1210, JEOL, Japan) เปรียบเทียบลักษณะทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดระหว่างสัตว์ที่ได้รับสารที่ให้ nitric oxide และกลุ่มควบคุม

วิธีการวัดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด (Quantitative Morphometric Study)

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดฝอยในเนื้อสมอง โดยกำหนดเกณฑ์ต่างๆเพื่อใช้เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงในสัตว์ทดลองที่ได้รับ nitroglycerin และกลุ่มควบคุม ในการศึกษานี้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในหลอดเลือดประเภท arteriole ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 10-30 micrometer parameter ที่ทำการศึกษาประกอบด้วยจำนวนของ microvilli, ขนาดของ mitochondria, จำนวนและความหนาแน่นของ pinocytic vesicle จำนวนและความหนาแน่นของ microvilli ได้จากการวัดหลอดเลือดทั้งสิ้น 50 arterioles แสดงผลของ microvilli เป็นจำนวนต่อ 1 vessel แสดงจำนวนและความหนาแน่นของ pinocytic vesicle เป็น vesicle per square micrometer ในส่วนของการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondria นั้น ศึกษาโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ mitochondria จากภาพกำลังขยาย 51,000 เท่า ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 100 mitochondria และหาค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม ในการทดลองนี้ระบุให้ mitochondria ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า mean + 2 SD ของค่าปรกติ เป็น mitochondria ที่มีการบวม (swollen)

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องผ่านพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมอง ดังนี้

การเปลี่ยนแปลงในจำนวนของ pinocytic vesicle ในภาวะปรกติ เซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดฝอยในสมองจะมีจำนวนของ pinocytic vesicle ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดในอวัยวะอื่นๆ จากการศึกษาครั้งนี้พบการเพิ่มจำนวนของ pinocytic vesicle อย่างชัดเจนในหลอดเลือดของกลุ่มที่ได้รับยา nitroglycerin โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวน pinocytic vesicle ในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 10-30 ไมโครเมตร เท่ากับ 9.63±0.70, 9.86±1.14 และ 28.84±1.36 vesicle/square micrometer สำหรับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 8 และ 10 mg/kg ตามลำดับ การเพิ่มของ pinocytic vesicle พบทั้งในด้าน luminal และ abluminal การเพิ่มจำนวนของ vesicle นี้บ่งชี้ถึงภาวะที่มีการเพิ่มของความสามารถในการซึมผ่าน ซึ่งแสดงว่าเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองถูกเสียความสามารถในการดักกั้นสารและมีการรั่วซึม

PCPA-pretreatment ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในจำนวนของ pinocytic vesicle ในสัตว์ทดลองที่ไม่ได้รับ nitroglycerin infusion ในทางตรงกันข้ามการได้รับ PCPA-pretreatment สามารถกระตุ้นให้การเกิด pinocytic vesicular formation ที่ตอบสนองต่อ nitroglycerin (8 mg/kg) infusion มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของ pinocytic vesicle ในสัตว์ทดลองที่ได้ nitroglycerin 8 mg/kg และ PCPA pretreatment เท่ากับ 16.62±2.83 vesicle/μm^2 (95%CI = 9.51 to 23.73, P<0.001)

การเพิ่มจำนวนของ microvilli ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เยื่อบุโพรงหลอดเลือดสมองของหนูกลุ่มที่ได้รับยา nitroglycerin จะมีการเพิ่มจำนวนของ microvilli เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีจำนวนของ microvilli ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยา nitroglycerin ขนาด 8 และ 10 mg/kg เท่ากับ 1.3±0.4, 3.4±0.8 และ 9.2±1.6 microvilli per vessel เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 10 mg/kg พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.005) การให้ PCPA pretreatment สามารถเพิ่มจำนวนของ nitric oxide-induced microvillous formation ในกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 8 mg/kg โดยมีค่าเฉลี่ยของความต่างเท่ากับ 6.12±1.87 microvilli/vessel (95%CI = 0.04 to 12.20, P=0.048) อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในสัตว์ทดลองที่ได้รับยา nitroglycerin ในขนาด 10 mg/kg เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้ PCPA-pretreatment และกลุ่มควบคุมที่ได้ nitroglycerin อย่างเดียว การเพิ่มจำนวนของ microvilli ที่พบนี้อาจบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการดูดซึมของเซลล์เยื่อบุโพรงหลอด

การเปลี่ยนแปลงของ mitochondria ในการศึกษานี้พบว่าความยาวเฉลี่ยของ mitochondria ในหนูกลุ่มควบคุมเท่ากับ 154.76±39.95 nm ดังนั้นในการศึกษานี้จึงกำหนดให้ mitochondria ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 235 nm (mean+2SD) เป็น mitochondria ที่มีการบวม ผลการศึกษาพบว่าการได้รับ nitroglycerin สามารถกระตุ้นให้ mitochondria เกิดการบวมโป่งพอง และมีการแตกสลายของ cristae เมื่อศึกษาสัดส่วนของ mitochondria ที่มีการโป่งพองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 8 และ 10 mg/kg พบว่ามีจำนวนคิดเป็นร้อยละ 3.15, 15.68 และ 23.53 ของจำนวนทั้งหมด (P<0.001) สัดส่วนนี้เพิ่มสูงขึ้นในสัตว์ทดลองที่ได้รับ PCPA pretreatment โดยพบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับยา nitroglycerin ขนาด 8 mg/kg โดยคิดเป็นร้อยละ 35.16 (P=0.002, เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาดเดียวกัน แต่ไม่ได้ pretreat ด้วย PCPA) PCPA pretreatment ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน NO-induced mitochondria swelling เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 10 mg/kg (ค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 28.42 และ 23.53 สำหรับกลุ่มที่ได้และไม่ได้ PCPA pretreatment ตามลำดับ, P=0.456)

การเปลี่ยนแปลงอื่นๆ นอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแล้ว การศึกษานี้พบว่า nitroglycerin infusion สามารถทำให้เกิดการบวมของ perivascular astrocytic footplate เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของหลอดเลือดที่มี perivascular footplate swelling ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 10 mg/kg จากหลอดเลือดกลุ่มละ 50 หลอดเลือดพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเท่ากับ 2 และ 29 หลอดเลือดตามลำดับ (odd ratio = 22.15, 95% CI = 4.50 to 47.64, P< 0.001) ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment และกลุ่มควบคุมที่ได้รับ nitroglycerin ในขนาดเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์เยื่อบุโพรงหลอดเลือดในกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin มีการ vacuolization ภายในขั้วไซโตพลาสมของเซลล์เยื่อบุโพรงหลอด ซึ่งยังไม่ทราบความสำคัญ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวน่าจะบ่งชี้ถึงการเสื่อมสภาพของเซลล์เยื่อบุโพรงหลอด การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเหล่านี้ชี้ชัดว่า nitric oxide สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุโพรงหลอด ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงที่พบไม่ได้เป็นผลจากการลดต่ำของความดันเลือดจนเกิดภาวะขาดเลือดของเนื้อเยื่อสมอง เนื่องจาก nitric oxide ในขนาดที่สูงจะเปลี่ยนแปลงกับ peroxynitrite ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (cytotoxic effect) จึงเป็นไปได้ว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นผลจากอนุมูลดังกล่าว

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของ PCPA pretreatment ต่อ nitroglycerin-induced ultrastructural changes ใน cerebral arterioles โดยเปรียบเทียบจำนวนของการเกิด microvillous formation และการเพิ่มขึ้นของ pinocytic vesicle

Group	Microvilli (villi/cell)		Pinocytic Vesicle (vesicel/□m²)	
	Mean±SEM 95% CI	P value	Mean±SEM 95% CI	P value
GTN 0 – PCPA -	1.3±0.4 0.2 to 2.3	1.000	9.68±0.70 7.74 to 11.62	1.000
GTN 0 – PCPA +	2.3±0.3 1.5 to 3.0		7.90±0.56 6.34 to 9.46	
GTN 8 – PCPA -	3.4±0.8 1.2 to 5.6	0.048	9.86±1.14 6.69 to 13.03	< 0.001
GTN 8 – PCPA +	9.5±1.8 4.6 to 14.4		26.48±1.76 21.61 to 31.35	
GTN 10 – PCPA -	9.2±1.6 4.8 to 13.6	1.000	28.84±1.56 24.51 to 33.17	1.000
GTN 10 – PCPA +	10.9±2.0 5.3 to 16.4		25.12±2.58 17.94 to 32.30	

GTN, nitroglycerin; PCPA, parachlorophenylalanine; GTN0, no GTN infusion; GTN8, 8 mg/kg GTN infusion; GTN10, 10 mg/kg GTN infusion; PCPA +, with PCPA pretreatment; PCPA -, without PCPA pretreatment.

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบจำนวนของ nitroglycerin-induced mitochondrial swelling ในเซลล์เยื่อบุ arterioles ระหว่างกลุ่มที่ได้ PCPA pretreatment และกลุ่มควบคุมที่ได้รับ GTN ในขนาดเดียวกัน พบว่าการศึกษาพบว่า PCPA pretreatment ทำให้ GTN-induced mitochondrial swelling มีจำนวนมากขึ้น

Groups	Mitochondria		Total
	Normal	Swelling	
GTN 8 mg/kg	86	16	102
GTN 8 mg/kg + PCPA	59	32	91

Odd ratio 2.92 (95%CI 1.40 – 6.14), P = 0.02 (Chi square)

Groups	Mitochondria		Total
	Normal	Swelling	
GTN 10 mg/kg	65	20	85
GTN 10 mg/kg + PCPA	68	27	95

Odd ratio 1.72 (95%CI 0.63 – 2.67), P = 0.46 (Chi square)

การศึกษาที่ 5

การศึกษาผลของ hyposerotonin ต่อ nitric oxide-evoked Fos expression ในเซลล์ประสาทกลุ่มต่างๆในก้านสมอง

เป็นการศึกษาผลของการพร่อง serotonin ต่อการกระตุ้นระบบรับความเจ็บปวดโดย nitric oxide โดยอาศัยลักษณะการแสดงออกของโปรตีน Fos ซึ่งศึกษาโดยการย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry วิธี Avidin Biotin Method

วิธีการศึกษา

หนูทดลองนี้ใช้หนูพันธุ์ Wistar ไม่จำกัดเพศ แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 3 ตัว ได้แก่ กลุ่ม hyposerotonin และกลุ่มควบคุม เตรียมให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะ hyposerotonin โดยฉีด para-chlorophenylalanine (PCPA) ซึ่งมีฤทธิ์เป็น tryptophan hydroxylase inhibitor ขนาด 300 mg/kg b.w. เข้าช่องท้อง จากนั้นเลี้ยงสัตว์ทดลองต่ออีก 3 วัน เพื่อให้สารสื่อประสาท serotonin ที่มีอยู่ถูกใช้ให้หมดไป จากนั้นจึงเตรียมการทดลองเพื่อศึกษาความเปลี่ยนแปลงของการเกิด Fos-like immunoreactivity ตอบสนองต่อสารที่เป็น nitric oxide donor สำหรับในกลุ่มทดลองฉีด normal saline ในปริมาตรเท่ากัน

หลังจากเลี้ยงสัตว์ทดลองไว้ 3 วัน เริ่มการทดลองโดยให้ nitroglycerin ในขนาด 10 mg/kg b.w. เข้าทางหลอดเลือดดำ โดยใช้เครื่อง infusion pump โดยให้ยาทั้งหมดภายใน 3 นาที 2 ชั่วโมงหลังจาก nitroglycerin infusion เตรียมกระบวนวิธี perfusion โดยทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลองตั้งแต่ระดับช่องท้องจนถึงหัวใจ เพื่อให้เห็นแทรกผ่านเห็นส่วนยอด (apex) ของหัวใจผ่านหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และสอดท่อยางที่ต่อเข้ากับเครื่อง perfusion ทำการ perfuse ด้วย phosphate buffer saline (PBS: pH 7.4) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และตามด้วยการระบายน้ำยา fixative ซึ่งใช้ 4% paraformaldehyde (pH 7.4) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองแข็ง จากนั้นนำมาผ่าตัดเปิดกะโหลกศีรษะ แยกส่วนกะโหลกศีรษะออก ตัดแยกสมองและไขสันหลังส่วนคอ (cervical spinal cord) นำชิ้นเนื้อที่ได้มาทำการ postfixation โดยแช่ใน 0.1 M PBS เก็บไว้ข้ามคืนในอุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจึงนำมาแช่ใน 30% sucrose in 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4 °C) แช่นานจนกระทั่งชิ้นเนื้อจมลงใน buffer เพื่อ cryoprotection เมื่อชิ้นเนื้อจมลงแล้วจึงนำมาตัดโดยใช้เครื่อง cryostat (Microm HM 50 N) โดยตัดในแนว coronal plane สำหรับส่วนสมอง และaxial plane สำหรับส่วนไขสันหลัง โดยตั้งความหนาของ slide ที่ 30 µm เก็บชิ้นเนื้อที่ตัดได้ไว้ใน 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4 °C) เพื่อเตรียมการย้อมด้วย immunohistochemistry สำหรับในกลุ่มควบคุมใช้ normal saline ฉีดแทนยา nitroglycerin

วิธี Immunohistochemistry Method

ในการศึกษานี้ใช้วิธี free floating method โดยนำชิ้นเนื้อที่ตัดได้มาล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วนำมาแช่ใน PBS ที่เติม 1% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (เพื่อลด endogenous peroxidase จากนั้นนำชิ้นเนื้อมา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS + 1% BSA + 0.3% Triton X-100) เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อลด non-specific binding แล้วจึงนำชิ้นเนื้อมา incubate กับ specific sheep anti-Fos antiserum (dilution 1:500) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นเนื้อทำปฏิกิริยากับ anti-Fos antibody จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาขั้นต้นแล้วมาล้างด้วย PBS-B (PBS + 0.25% BSA + 0.1% Triton X-100) 3 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยาขั้นที่สองกับ biotinylated rabbit anti-sheep IgG (dilution 1:400) ใน PBS-B เป็นเวลา 60

นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS นำชิ้นเนื้อไปทำให้เกิดสีโดยวิธี ABC complex ด้วย ABC-streptavidin horseradish peroxidase complex (dilution 1:250) ใน PBS แช่ชิ้นเนื้อเป็นเวลา 60 นาทีจากนั้นล้างทิ้ง แล้วนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปทำปฏิกิริยาขั้นสุดท้าย โดยแช่ในสารละลาย Tris-HCl buffer (pH 7.6) ที่เติม 0.25% 3,3' diaminobenzidine (DAB) และ 0.01% H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที นำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วมาล้างและติดบน gelatinized glass slide และปิดด้วย cover slip นำ slide ที่ได้มาดูโดยใช้ light microscope เซลล์ที่มี Fos-like immunoreactivity (FLI) จะติดสีน้ำตาลเข้ม (dark brown) ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของกลุ่มเซลล์ประสาทที่มี FLI และทำการนับจำนวนเซลล์ดังกล่าว เปรียบเทียบจำนวนของ FLI ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment

ผลการศึกษา

ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ nitroglycerin เพียงครั้งเดียวจะพบเซลล์ที่พบ FLI ในกลุ่มเซลล์ประสาทต่างๆทั้งในระดับ lower brainstem, epithalamus และ hypothalamus ในระดับก้านสมองพบเซลล์ที่ติดสี FLI ในกลุ่มเซลล์ nucleus of tractus solitarius (NTS), nucleus reticularis lateralis (LRN), trigeminal nucleus caudalis (TNC) และ inferior olive (IO) ส่วนในระดับ epithalamus และ hypothalamus จะพบเซลล์ที่มี FLI อยู่ในกลุ่ม habenular, supraoptic nucleus และ paraventricular nucleus

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในจำนวน FLI อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทั้งสอง (รายละเอียดตามตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบความแตกต่างของ nitric oxide-evoked Fos immunoreactivity ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment และกลุ่มควบคุม แสดงผลเป็น median และ interquartile range ผลการศึกษาไม่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทั้งสอง

Area	Group	Median	IQ Range	P-value
TNC	Control	140	134-160	.851
	PCPA	156	138-164	
Lateral reticular nucleus	Control	240	188-262	.678
	PCPA	204	168-286	
Nucleus tractus solitarius	Control	232	168-398	.724
	PCPA	188	154-374	
Inferior olive	Control	178	98-202	.092
	PCPA	154	120-158	

สรุปผลการศึกษา

1. การศึกษาโดยวิธี intravital fluorescent video-microscope monitoring แสดงให้เห็นว่าหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองมีการตอบสนองต่อสารที่ให้ nitric oxide โดยลักษณะการตอบสนองนั้นแตกต่างกันไปตามขนาดของหลอดเลือด ถึงแม้ว่าหลอดเลือดสมองระนาบการขยายตัวเมื่อได้รับ nitric oxide แต่จากการศึกษานี้ไม่พบการรั่วของสารจากหลอดเลือด ซึ่งบ่งชี้ว่าหลอดเลือดเหล่านี้ยังมีการทำงานของ blood-brain barrier เป็นปกติ

2. แม้ว่าจะไม่มีการรั่วของสารอณูใหญ่โดยการศึกษาทางสรีรวิทยา แต่จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า สาร nitric oxide ขนาดสูงสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยนโดธีเลียม โดยทำให้เกิด vacuolization และ microvilli formation ในเซลล์เยนโดธีเลียม และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ mitochondria ในเซลล์เยนโดธีเลียม คือ เกิด ballooning และ cristae rupture

3. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นแสดงว่า nitric oxide สามารถยกนี่ยวนำให้เซลล์เยนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองเกิดพยาธิสภาพ ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่พบคล้ายกับที่พบในเซลล์ที่เกิด apoptosis

4. การได้รับสารที่เป็น NO donating agent สามารถกระตุ้นให้เกิด Fos expression ขึ้นใน เซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับ pain processing circuit รวมทั้ง neuroendocrine neuron ที่สัมพันธ์กับ stress response

5. การศึกษาโดยวิธี intravital fluorescent video-microscope monitoring แสดงให้เห็นว่าหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองมีการตอบสนองต่อสารที่ให้ nitric oxide เปลี่ยนแปลงไปในภาวะที่มีการพร่องของ serotonin กล่าวคือทำให้การขยายตัวของหลอดเลือดมีขนาด (magnitude) และระยะเวลา (duration) มากขึ้น ผลการเปลี่ยนแปลงนี้จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อกระตุ้นให้หลอดเลือดขยายตัวโดยใช้ nitroglycerin ในขนาด 8 mg/kg การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการรั่วของสาร fluorescein-labelled dextran จากหลอดเลือด

6. การเปลี่ยนแปลงของ ultrastructure ของหลอดเลือด cerebral arteriole ที่ตอบสนองต่อสาร nitroglycerin นี้จะเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เพิ่มขึ้น หากสัตว์ทดลองอยู่ในภาวะที่พร่อง serotonin

7. ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวน Nitric oxide-evoked Fos-immunoreactive cell ในก้านสมองระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment (hyposerotonin group) และกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin เพียงอย่างเดียว

8. จากผลการศึกษาทั้งทาง microvascular physiology, ultrastructures ของ cerebral arterioles และ noxious stimulation-evoked Fos immunoreactivty บ่งชี้ว่า PCPA pretreatment ซึ่งทำให้เกิดภาวะ hyposerotonin สามารถยกนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองมีความไวต่อการได้รับสารที่เป็น nitric oxide donating agent มากขึ้น อย่างไรก็ตามภาวะพร่อง serotonin ไม่ทำให้ปริมาณของ Fos immunoreactive cell ที่ถูกกระตุ้นโดย nitric oxide เพิ่มขึ้น

DISCUSSION

- Response of Cerebral Microvessels to Nitric oxide
- Effect of Serotonin Depletion on Nitric Oxide-Induced Vascular Response
- Effect of Serotonin Depletion on Nitric Oxide-Evoked Fos Expression in Brainstem Neurons

การวิเคราะห์ผล

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าหลอดเลือดสมองและเยื่อหุ้มสมองมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาเมื่อได้รับสารที่เป็น nitric oxide donor ในขนาดที่สูง การตอบสนองต่อ nitric oxide เหล่านี้จะเป็นมากขึ้นเมื่อสัตว์ทดลองอยู่ในภาวะพร่อง serotonin

<u>การตอบสนองของหลอดเลือดชั้น pia และหลอดเลือดสมองต่อ nitric oxide</u>

ผลการศึกษาพบว่าหลอดเลือดของเยื่อหุ้มสมองจะมีการขยายตัวต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลังจากได้รับสาร nitroglycerin ซึ่งเป็น nitric oxide donor นอกจากนี้จากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาดังกล่าวการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนยังพบการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของเซลล์เอนโดธีเลียมในหลอดเลือดต่อของสมอง เนื่องจากยา nitroglycerin ในขนาดที่ให้ทำให้เกิดการลดต่ำของความดันเลือดแดงเพียงร้อยละ 10 ซึ่งไม่น่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้าง นอกจากนี้ในการทดลองยังได้ควบคุมให้ภาวะความเป็นกรด-ด่างของเลือดอยู่ในช่วงปกติตลอดการศึกษา ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่พบน่าจะเป็นผลโดยตรงจาก nitric oxide

สาร nitric oxide เป็นสารที่มีความสำคัญยิ่งในกระบวนการควบคุมความดันตัวของหลอดเลือดสมอง สารดังกล่าวทำให้เกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือด ซึ่งเป็นผลให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด การลดต่ำลงของสารนี้สามารถทำให้เกิดการหดเกร็งของหลอดเลือด ดังที่พบเป็นภาวะแทรกซ้อน (diffuse vasospasm) ของการตกเลือดในเยื่อหุ้มสมอง (subarachnoid hemorrhage) นอกจากนี้ nitric oxide ยังมีบทบาทสำคัญในการปรับปริมาณของเลือดที่ไปยังเนื้อสมองให้สัมพันธ์กับอัตราการทำงานของเนื้อสมองบริเวณนั้น (metabolic coupling) แม้ว่า nitric oxide จะเป็นสารที่มีหน้าที่สำคัญดังกล่าว การได้รับสาร nitric oxide ในขนาดที่สูงสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ จากการศึกษาชนิด in vitro พบว่าเมื่อเซลล์เอนโดธีเลียมอยู่ในภาวะ oxidative injury จะมีการกระตุ้นเอนไซม์ nitric oxide synthase ให้สร้างสาร nitric oxide มากขึ้น (Shimizu et al 1998a) นอกจากนี้ยังพบว่าการลดการสร้าง nitric oxide สามารถลดการตายของเซลล์เอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย hemolysate (Kwan et al 1997)

ในการศึกษานี้พบการขยายตัวของหลอดเลือดเมื่อได้รับ nitroglycerin และการขยายตัวนั้นคงอยู่เป็นเวลานานกว่า 60 นาที ซึ่งลักษณะการตอบสนองดังกล่าวมีลักษณะที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจาก nitric oxide เป็นสารที่มีฤทธิ์สั้น และมีกลุ่มทำลายอย่างรวดเร็วหลังจากถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ต้นกำเนิด ดังนั้นการขยายตัวอยู่เป็นเวลานานนั้นน่าจะเป็นผลจากสารใดสิ่งหนึ่งที่ถูกกระตุ้นด้วย nitric oxide หรืออาจเป็นผลจากพยาธิสภาพของหลอดเลือดจากการถูกกระตุ้นด้วย nitric oxide ในขนาดสูง

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดธีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองที่พบในการศึกษานี้ประกอบด้วย การเพิ่มจำนวนของ pinocytic vesicle การเกิด microvillous formation, การโป่งพองของ mitochondria และยังพบการบวมของ astrocytic footplate และการแยกตัวของหลอดเลือดออกจากเนื้อสมอง การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยานี้อาจบ่งถึงการทำงานที่เปลี่ยนแปลงหรือพยาธิสรีรวิทยาที่เกิดขึ้น อาทิ การเพิ่มของ microvillous formation ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวด้านในของหลอดเลือด (luminal surface) เพิ่มขึ้นน่าจะบ่งถึงการเพิ่มของกระบวนการ uptake และการขนส่งสารผ่านเซลล์เอนโดธีเลียม (transendothelial transportation) การเพิ่มขึ้นของ microvillous formation ในหลอดเลือดต่อของสมองนี้สามารถพบได้ในภาวะที่มีความผิดปรกติของ blood-brain barrier (Lossinsky et al 1995) การพบการเพิ่มขึ้นของ pinocytic vesicle ในเซลล์เอนโดธีเลียมกับสนุนสมมติ

ฐานของการเปลี่ยนแปลงในการทำงานของระบบ blood-brain barrier ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันสามารถพบได้ในภาวะที่เกิดการทำลายของ blood-brain barrier อาทิ concussive cerebral injury หรือ hypertensive cerebrovascular disease (Hazama et al 1978, Wei et al 1980) รวมเดียวกันการพบการบวมของ astrocytic footplate นั้นอาจบ่งถึงการตอบสนองของเซลล์ astrocyte ต่อการรั่วของสารต่างๆจากหลอดเลือด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาโดย intravital fluorescem study นั้นไม่พบการรั่วของสาร fluorescein-labelled dextran ออกจากหลอดเลือด

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่พบในการศึกษานี้อาจเป็นการตอบสนองของเซลล์หลอดเลือดต่อ nitric oxide โดยตรง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของความดันเลือดเพียงเล็กน้อย และสภาพทางสรีรวิทยาต่างๆของสัตว์ทดลองนั้นอยู่ในภาวะที่คงที่ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่น่าจะมีความจำเพาะ (specific) ต่อ nitric oxide ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าว อาจพบได้ในภาวะอื่นๆ อาทิ การโป่งพองของ mitochondria สามารถพบได้ในภาวะเนื้อสมองขาดเลือด (cerebral ischemia) (Romansky and Stamenov 1995), ภาวะพิษจาก ethanol (Okokawa et al 1984) หรือการโป่งตัวของตัวเซลล์เอนโดธีเลียมสามารถพบได้ในสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นเส้นประสาท trigeminal (Dimmendaal et al 1992)

กลไกที่สาร nitric oxide ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เอนโดธีเลียมนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด nitric oxide สามารถจับกับ oxygen ทำให้เกิด peroxynitrite รวมทั้งอนุมูลอิสระอื่นๆ (Beckman et al 1990) สาร peroxynitrite ที่ถูกสร้างขึ้นสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เอนโดธีเลียมโดยกระบวนการ lipid peroxidation รวมกับ peroxidation ของกลุ่ม sulfhydryl (Radi et al 1991a and b) อย่างไรก็ตามการศึกษาในระยะหลังพบว่าบทบาทของ nitric oxide และ reactive oxygen intermediate ในกระบวนการ peroxide-mediated endothelial toxicity นั้นมีความซับซ้อน และยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัด บางการศึกษาพบว่าสาร nitric oxide น่าจะมีส่วนช่วยในการอยู่รอดของเซลล์เอนโดธีเลียม อาทิ การศึกษาของ Kanwalya and Nath (1998) ซึ่งพบว่าการให้สาร nitric oxide donor สามารถลดการตายของเซลล์เอนโดธีเลียมที่ถูกทำลายโดยเซลล์ neutrophil หรือการศึกษาของ degrim et al (1998) ซึ่งพบว่าการให้สาร S-nitro-N-acetylpenicillamine (SNAP) ซึ่งเป็น nitric oxide donor สามารถยับยั้ง peroxidant-mediated endothelial cell injury ได้ ในทางตรงกันข้าม การศึกษาของ Hideka et al (1997) กลับพบว่า nitric oxide ในระดับสูงซึ่งถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์นิวโตรฟิลขาวเป็นตัวการสำคัญในการทำลายเซลล์เอนโดธีเลียม เป็นที่ทราบกันดีว่า reactive oxygen species ที่เป็นอนุมูลอิสระนั้นมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ apoptosis ทั้งในขั้นตอน induction และ effector stage จากการศึกษาของ Shen et al (1997) พบว่า nitric oxide อาจมีบทบาททั้งส่งเสริมและยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis ซึ่งทั้งนี้อาจอาศัย transduction process ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่เป็นลักษณะจำเพาะของ apoptosis อาทิ chromatin clumping นั้นไม่พบในการศึกษาครั้งนี้

<u>ผลของภาวะพร่อง serotonin ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อ nitric oxide:</u>
<u>บทบาทในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน</u>

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของภาวะพร่อง serotonin ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อ nitric oxide ซึ่งได้มีการทำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะพร่อง serotonin โดยใช้สาร para-chlorophenylalanine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tryptophan hydroxylase จากการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดต่อ nitric oxide

นั้นเพิ่มขึ้นทั้งทางสรีรวิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง ซึ่งแสดงว่าภาวะ hyposerotonin สามารถส่งผลให้หลอดเลือดสมองมีความไวต่อ nitric oxide มากขึ้น (supersensitivity)

Nitric oxide เป็นสารที่คาดจะมีบทบาทที่สำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน สมมติฐานเริ่มจากข้อสังเกตที่พบว่าผู้ป่วยโรคปวดศีรษะไมเกรนจะมีอาการปวดศีรษะเมื่อได้รับยากลุ่ม nitrate อาทิ nitroglycerin โดยมีความรุนแรงของอาการมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากอาการปวดที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับสาร nitrate compounds แล้ว การได้รับสารกลุ่มดังกล่าวยังกระตุ้นให้เกิดอาการปวดศีรษะในภายหลัง (delayed headache) ซึ่งอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้นนี้มีลักษณะที่เข้าได้กับอาการปวดในขณะที่เกิดอาการไมเกรน (Olesen et al 1993) และยังพบว่าสารกลุ่ม nitrate ยังกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดสมองในผู้ป่วยไมเกรนเป็นระยะเวลานานกว่ากลุ่มควบคุม (Ballantine et al 1997) เป็นที่น่าสนใจว่าการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อ nitroglycerin ในหนูที่ได้รับ PCPA ที่พบในการศึกษานี้มีระยะเวลาการขยายตัวนานกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน การศึกษาในระยะหลังที่พบว่าการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง nitric oxide ขึ้นในขณะที่เกิด cortical spreading depression (Read et al 1997) นั้นยืนยันถึงบทบาทของ nitric oxide ในพยาธิกำเนิดของโรคไมเกรนนอกจากฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดแล้ว สาร nitric oxide ยังมีบทบาทในกระบวนการเกิด neurogenic sterile inflammation โดยกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารต่างๆออกจากร่างแหประสาทรอบหลอดเลือด (perivascular nerve plexus) ซึ่งกลไกดังกล่าวอาจอธิบายการเกิดอาการปวดที่เกิดขึ้นภายหลัง (nitric oxide-induced delayed headache) ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยไมเกรน รวมถึง delayed vasorelaxation ที่พบในการศึกษานี้ นอกจากนี้ nitric oxide ยังอาจเกี่ยวข้องกับการส่งผ่านสัญญาณประสาทในระบบ pain pathway โดยปรับความทน (threshold) ต่อการปวด ดังผลการศึกษาของ Thomsen et al (1996) ซึ่งพบว่า nitroglycerin สามารถลดความทนทานต่อความเจ็บปวดบริเวณขมับ (temporal area) ที่วัดโดย pressure algometry

แม้ว่าหลักฐานต่างๆจะบ่งชี้ว่าผู้ป่วยไมเกรนมีความไวต่อ nitric oxide มากกว่าปรกติ (supersensitivity) แต่กลไกที่ทำให้เกิดภาวะดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษาด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระบบ nitric oxide อาทิ polymorphism ของ gene สำหรับ endothelial nitric oxide synthase ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการวินิจฉัยทางคลินิก (Griffiths et al 1997) ซึ่งแสดงว่า gene นี้ไม่น่าจะมีบทบาทในพยาธิกำเนิดของโรค สมมติฐานที่อาจเป็นไปได้อีกประการหนึ่งคือ supersensitivity ต่อ nitric oxide ที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลจากปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลทางอ้อม ผลการศึกษาของ Sanchelli et al (1996) ซึ่งพบว่าระบบ metabolism ของ nitric oxide ในผู้ป่วย menstrual migraine สามารถเปลี่ยนแปลงไปตาม phase ของ menstruation เป็นข้อมูลที่สนับสนุนว่าปัจจัยภายนอกอาจมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงความไวในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ nitric oxide

สารสื่อประสาท serotonin เป็นสารที่มีความสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจนคือการลดต่ำลงของระดับ serotonin ในเกร็ดเลือดของผู้ป่วยไมเกรนในขณะที่มีอาการปวดศีรษะ (Anthony et al 1969) นอกจากนี้ยังพบว่ายาที่ทำให้เกิดการพร่องของ serotonin เช่น reserpine สามารถทำให้เกิดอาการปวดศีรษะในผู้ป่วยไมเกรนได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพัฒนารูปแบบจำลอง (experimental model) เพื่อศึกษาผลของการลดต่ำลงของ serotonin ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดสมองและเยื่อหุ้มสมองต่อ nitric oxide การทำการขยายตัวของหลอดเลือดอยู่เป็นเวลานานกว่ากลุ่มควบคุม รวมถึงการ

เปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่มากขึ้น สนับสนุนว่าการเพิ่มขึ้นของการตอบสนองต่อ nitric oxide ที่พบในผู้ป่วยไมเกรนน่าจะเป็นผลจากการลดค่าลงของ serotonin มากกว่าการเปลี่ยนแปลงของระบบ nitric oxide โดยตรง

ในปี 1995 Fozard ได้เสนอสมมติฐานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง nitric oxide และ serotonin ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน โดยเชื่อว่า serotonin ที่ถูกปลดปล่อยออกจากปลายประสาทหรือเกร็ดเลือดในช่วงการเกิดอาการปวดศีรษะไมเกรนจะกระตุ้นตัวรับชนิด 5-HT$_{1B}$ หรือ 5-HT$_{1C}$ serotonin receptor บนผนังของหลอดเลือดโดยตรงและส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการสร้าง nitric oxide สาร nitric oxide ที่สร้างขึ้นจะกระตุ้นปลายประสาทรับความรู้สึก (nociceptor terminal) ทำให้เกิด nociception นอกจากนั้นยังกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทหรือสาร peptides ชนิดต่างๆ และเป็นผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ permeability ของหลอดเลือดและมีการรั่วของสารโปรตีนออกจากหลอดเลือด (plasma protein extravasation) รวมทั้งเกิดภาวะ hyperalgesia ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่านอกเหนือจากสมมติฐานดังกล่าว การเปลี่ยนแปลงในระบบ serotonin ในสมองยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ nitric oxide ด้วย สำหรับกลไกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับการหลั่ง serotonin ในผู้ป่วยไมเกรนนั้นยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน กลไกที่อาจเป็นไปได้ อาทิ ความผิดปรกติของ calcium channel ซึ่งทำให้กระบวนการปลดปล่อยสารสื่อประสาทซึ่งเป็นกลไกที่มีลักษณะเป็น calcium-dependent mechanism เปลี่ยนแปลงไป ดังที่มีผู้สนอไว้ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรนชนิด familial hemiplegic migraine (Ophoff et al 1997) จากการศึกษาของ Srikiatkhachorn et al (1998) ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงใน hemiplatelet canaliculi ของผู้ป่วยไมเกรน (canaliculi นี้เป็นช่องทางในการปลดปล่อย serotonin ออกจากเกร็ดเลือด ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเป็น calcium-dependent process) สนับสนุนสมมติฐานเกี่ยวกับความผิดปรกติในกระบวนการปลดปล่อย serotonin

<u>บทบาทของ serotonin depletion ต่อ nitric oxide-induced Fos expression ในเซลล์ประสาท</u>

จากการศึกษาโดย intravital fluorescein microscopic monitoring และการศึกษาทางพยาธิวิทยาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่า หลอดเลือดสมองจะมีความไวต่อ nitric oxide เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะพร่อง serotonin อย่างไรก็ตามผลการศึกษาโดย Fos immunoreactivity ไม่ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment ในจำนวนของ Fos immunoreactive cell

นอกเหนือจากบทบาทในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดแล้ว ผลการศึกษาจำนวนมากบ่งถึงบทบาทของ nitric oxide ในกระบวนการ nociceptive transmission และ modulation จากการศึกษาของ Wang et al (1999) พบว่า จำนวนของ FLI ในไขสันหลังในสัตว์ทดลองที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่ตัวอย่างจะลดลงหากให้สารที่เป็น nitric oxide synthase inhibitor เข้าในตำแหน่งที่มีการอักเสบ ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงว่า nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้นในตำแหน่งที่เกิดการอักเสบมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นตัวรับ nociceptor นอกเหนือจากบทบาทที่ peripheral axon แล้ว ยังมีผลการศึกษาที่แสดงว่า nitric oxide น่าจะมีบทบาทในกระบวนการของ pain perception ในระบบประสาทส่วนกลางด้วย ตัวอย่าง เช่น Gao and Qiao (1998) พบว่าการให้สารที่เป็น nitric oxide synthase inhibitor เข้าในช่องไขสันหลัง (intrathecal injection) สามารถลดจำนวนของ FLI ที่กระตุ้นโดย noxious stimulus ได้ นอกจากนี้การศึกษาทางกายวิภาคที่พบว่าเซลล์ที่ย้อมติด NAPDH-diaphorase ซึ่งบ่งว่าเป็น nitric oxide producing neuron นั้นอยู่ใกล้ชิดกับเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่ในกระบวน nociceptive processing (Rodella et al

1999) แสดงถึงบทบาทของ nitric oxide ในกระบวนการปรับการเกิดความเจ็บปวดในระดับเหนือไขสันหลัง (supraspinal nociceptive modulation)

สำหรับบทบาทของของ nitric oxide ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับอาการปวดศีรษะจากหลอดเลือดหรือ vascular headache นั้น ในปัจจุบันเชื่อว่าสารนี้น่าจะเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะทั้งในโรคปวดศีรษะไมเกรนและ cluster จากการศึกษาของ Christiansen et al (1999) พบว่าสารที่เป็น nitric oxide donor สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการปวดศีรษะที่มีลักษณะเช่นเดียวกับ migraine without aura ในผู้ป่วยโรค migraine with aura ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงว่า nitric oxide สามารถกระตุ้นปลายประสาทที่ทำหน้าที่รับ noxious stimulation ได้โดยตรง โดยไม่ต้องอาศัยกลไกของระบบประสาทที่เป็นพยาธิกำเนิดของระยะ aura (ซึ่งอาจได้แก่การเกิด cortical spreading depression) สมมติฐานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ซึ่งพบว่าสาร nitric oxide สามารถกระตุ้นให้เกิด Fos immunoreactivity ขึ้นได้ในกลุ่มเซลล์ต่างๆรวมทั้ง trigeminal caudalis nucleus ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์สำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่เกี่ยวกับอาการปวดบริเวณศีรษะและใบหน้า (craniofacial pain)

ลักษณะการกระจายของ Fos immunoreactivity ที่พบในการศึกษานี้มีลักษณะเช่นเดียวกับการศึกษาของ Tassorelli and Joseph (1995a) ลักษณะที่น่าสนใจคือเซลล์ประสาทในสมองที่ย้อมติด FLI บางส่วนเป็น NADPH diaporase positive ด้วย ซึ่งแสดงว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นนี้ส่วนหนึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้าง nitric oxide ได้ จากการศึกษาของ Kayikcioglu-Cullik and Vezzani (1999) พบว่าการให้สารที่เป็น nitric oxide donor สามารถกระตุ้นให้เกิด heading ใน NOS-immunoreactive nerve fiber ในเยื่อหุ้มสมอง dura ซึ่งผลการศึกษาเหล่านี้บ่งว่าสาร nitric oxide ที่ให้จากภายนอก สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง nitric oxide ภายในร่างกายมากขึ้น สาร nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้นภายในร่างกายนี้อาจเป็นสาเหตุของการเกิดขยายตัวของหลอดเลือดแดงเวลานานดังที่พบในการศึกษานี้ รวมทั้งอาจอธิบายการเกิด delayed nitric oxide-induced headache ในผู้ป่วยไมเกรนที่ได้รับยาที่เป็น nitric oxide donor

ความสัมพันธ์ระหว่าง nitric oxide และ serotonin ในกระบวนการเกิดความเจ็บปวดจากการกระตุ้นหลอดเลือดในโพรงกะโหลกศีรษะนั้นมีความซับซ้อน ทั้งนี้เนื่องจากผลที่เกิดขึ้นเป็นผลรวมจากการออกฤทธิ์ผ่านตัวรับหลายชนิด นอกเหนือจากสมมติฐานของ Feniuk เกี่ยวกับผลของ serotonin ในการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ธรรมดาโดยเกี่ยวข้องกับการทำงานของตัวรับ 5-HT_{1B}-5-HT_{2C} แล้ว serotonin ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ทั้งนี้โดยผ่านตัวรับชนิด 5-$HT_{1B/1D}$ receptor (Skepper et al 1999) ในการศึกษานี้แม้จะพบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ nitric oxide จะเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีการขาดของ serotonin แต่กลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทที่ย้อมติด Fos immunoreactivity หลังจากถูกกระตุ้นด้วย nitric oxide ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความต่างในชนิดของตัวรับ serotonin ที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1987 Markowitz et al ได้เสนอสมมติฐานที่สำคัญเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสรีรวิทยาของหลอดเลือดบริเวณศีรษะโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดการอักเสบปลอดเชื้อรอบหลอดเลือด (perivascular sterile inflammation) และการรั่วของสารโปรตีนออกจากหลอดเลือด (plasma protein extravasation) และพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะในภาวะไมเกรน ซึ่งเป็นแนวความคิดที่มีผู้ให้ความเชื่อถือยู่เป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามการศึกษาในระยะหลังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดดังกล่าวน่าจะเป็นเหตุการณ์ที่เกิดร่วม (epiphenomenon) มากกว่าที่จะมีความสัมพันธ์ในเชิงเป็นเหตุและผล ตัวอย่างการศึกษาดังกล่าว ได้แก่ การศึกษาของ Goadsby and

Hoskin ในปี 1999 ซึ่งพบว่าสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการรั่วของสารโปรตีนออกจากหลอดเลือด ไม่สามารถลดจำนวนของเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ trigeminal nucleus caudalis ที่ตอบ FLI หลังการกระตุ้นหลอดเลือด superior sagittal sinus ด้วยไฟฟ้า ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาทางคลินิก โดย Roon et al (2000) พบว่ายา CP-122,288 ในขนาดที่ยับยั้งการรั่วของสารโปรตีนจากหลอดเลือด ไม่สามารถลดความรุนแรงของอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยไมเกรน จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าการอักเสบปลอดเชื้อรอบหลอดเลือดและการรั่วของสารโปรตีนอาจไม่มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเกิดอาการปวดศีรษะในภาวะไมเกรนดังที่เคยเชื่อมาในอดีต ผลการศึกษาครั้งนี้ซึ่งพบว่าจำนวนของ Fos immunoreactive neuron ในก้านสมองมิได้เปลี่ยนแปลงในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงในหลอดเลือดเมื่ออยู่ในภาวะพร่อง serotonin ก็นับว่าการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและการกระตุ้นกระบวนการเกิดความเจ็บปวดนั้นอาจไม่มีความสัมพันธ์โดยตรง

สรุป

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดในเยื่อหุ้มสมองชั้น pia และหลอดเลือดในสมองจะมีความไวในการตอบสนองต่อสาร nitric oxide มากขึ้นเมื่อสัตว์ทดลองอยู่ในภาวะที่พร่อง serotonin โดยเห็นได้จากการขยายตัวของหลอดเลือดที่มีขนาด (magnitude) และระยะเวลาของการตอบสนองนานขึ้น นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดสมองที่บ่งว่าหลอดเลือดเหล่านี้มีการเพิ่มของ permeability การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาทิ การเพิ่มจำนวนของ pinocytic vesicle, การเกิด microvillous formation หรือ astrocytic footplate swelling เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งว่าสาร nitric oxide ในขนาดที่สูงสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์บนโดยเฉพาะของหลอดเลือด เช่น การเกิด focal swelling ของตัวเซลล์บนโดยเฉพาะ หรือการบวมของ mitochondria เป็นต้น

การศึกษาครั้งนี้พบว่าสาร nitric oxide ในขนาดที่สูงสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Fos protein ขึ้นในส่วนต่างๆของสมอง รวมทั้ง trigeminal nucleus caudalis ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์สำคัญในกระบวนการส่งทอดสัญญาณประสาทที่เกี่ยวกับ craniofacial nociception ซึ่งผลการศึกษานี้ยืนยันถึงบทบาทของ nitric oxide ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่าภาวะพร่อง serotonin จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในจำนวนของ Fos immunoreactive neuron ซึ่งความแตกต่างระหว่างการศึกษาที่หลอดเลือดและการศึกษา FLI นี้อาจเป็นผลจากความหลากหลายของตัวรับ serotonin ที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 1996; 379: 257-262

Andres KH, von During M, Muszynski K, Schmidt RF. Nerve fibers and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat Embryol* 1987; 175: 289-301.

Anthony M, Hinterberger H, Lance JW. The possible relationship of serotonin to the migriane syndrome. *Res Clin Stud Headache.* 1969;2:29-59.

Ballantonio P, Micieli G, Buzzi MG, Marcheselli S, Castellano AE, Rossi F, Nappi G. Haemodynamic correlates of early and delayes responses to sublingual administration of isosorbide dinitrate in migraine patients: a transcranial Doppler study. *Cephalagia* 1997;17:183-187

Baumbight GC, Farsci FM, Heistad DD. Endothelium-derived relaxing factor modulates noradrenergic constriction of cerebral arterioles in rabbits. *Stroke* 1992; 23: 1522-6.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 1620-1624

Beggs JL, Waggener JD. Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury to the spinal cord. *Lab Invest* 1976; 34: 428-39

Bernard JF, Peschanski M, Besson JM. A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. *Neurosci Lett* 1989; 100: 83-88.

Betz AL, Goldstein GW, Katzman R. Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. In Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects.* 5th ed. New York: Raven Press, 1994; 681-99

Betz AL. Sodium transport from blood to brain: inhibition by furosemide and amiloride. *J Neurochem* 1983; 41: 1150-7

Boissonade FM, Sharkey KA, Lucier GE. Trigeminal nuclear complex of the ferret: anatomical and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* 1993; 329: 291-312.

Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992; 587: 250-6.

Bove GM, Moskowitz MA. Primary afferent neurons innervating guinea pig dura. *J Neurophysiol* 1997;77:299-308.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-8.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-70.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8:3-11.

Bruce LL, McHaffie JG, Stein BE. The organization of the trigeminotectal and trigeminothalamic neurons in rodents: a double-labeling study with fluorescent dyes. *J Comp Neurol* 1987;262:315-330.

Brune B, Lapetina EG. Activation of a cytosolic ADP-ribosyltranferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem* 1989; 264: 8455-8.

Bruning TA, Chang PC, Blauw GJ, Verweij P, van Zwieten PA. Serotonin-induced vasodilatation in the human forearm is mediated by the "nitric oxide-pathway": no evidence for involvement of the $5HT_2$ receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 44-51

Bullitt E. Expression of c-fos-like immunoreactive protein for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 296: 517-30

Burstein R, Woolf CJ. Central sensitization and headache. In: In: Olsen J, Tfelt-Hansen P, Welch KMA, eds. *The Headache*. Second edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000;125-131.

Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 1998;79:964-982.

Caplan LR. Chronic vascular disease of the brain. In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press, 1997: 307-12

Carlos TM, Clark RS, Franicola-Higgins D, Schiding JK, Kochanek PM. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leuk Biol* 1997; 61: 279-85.

Chen L, Huang L-YM. Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 1992;356:521-523.

Chillon J-M, Baumbach GL. Autoregulation of cerebral blood flow. In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press, 1997: 51-4

Chopp M, Chen Q, Zhang ZG. Nitric oxide synthase is induced in cerebral endothelial cells by spreading depression. *Cephalalgia* 1993; 13(suppl 13): S117

Christiansen I, Thomsen LL, Daugaard D, Ulrich V, Olesen J. Glyceryl trinitrate induces attacks of migraine without aura in sufferers of migraine with aura. *Cephalalgia* 1999;19:660-7.

Chudler EH, Anton F, Dubner R, Kenshalo DR Jr. Responses of nociceptive SI neurons in monkeys and pain sensation in humans elicited by noxious thermal stimulation: effect of interstimulus interval. *J Neurophysiol* 1990;63:559-569.

Coderre TJ, Yashpal K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur J Neurosci* 1994; 6: 1328-34

Collins T, Palmer HJ, Whitley MZ, Neish AS, Williams AJ. A common theme in endothelium activation. *Trends Cardiovasc Med* 1993; 3: 92-7

Cook AJ, Woolf CJ, Wall PD, McMahon SB. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C primary afferent input. *Nature* 1987;325:151-153.

Craig AD, Burton H. Spinal and medullary lamina I projection to the nucleus submedius in medial thalamus: a possible pain center. *J Neurophysiol* 1981;45:443-466.

Craig AD, Dostrovsky JO. Processing of nociceptive information at supraspinal levels. In: Yaksh TL, Lynch C 3rd, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ, eds. *Anesthesia: Basic Foundations*. Philadelphia: Lippincott-raven, 1997:623-642.

Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular epithelium. *Brain Res* 1982; 241: 49-55

Crone C, The blood-brain barrier: a modified tight epithelium. In Suckling AJ, Rumsby MG, Bradbury MWB, editors. *The Blood-Brain Barrier in Health and Disease*. Chichester: Ellis Horwood, 1996: 17-40.

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5134-8

Dalkara T,Moskowitz MA. Nitric oxide and the cerebral circulation. In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesj BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press, 1997: 96-8

Dauphin F, Lacombe P, Sercombe R, et al. Hypercapnia and stimulation of the substantia innominata increase rat frontal cortical blood flow by different cholinergic mechanisms. *Brain Res* 1991; 553: 75–83.

Davis KD, Dostrovsky JO. Activation of trigeminal brainstem nociceptive neurons by dural artery stimulation. *Pain* 1986;25:395–401.

Davis KD, Dostrovsky JO. Responses of feline trigeminal spinal tract nucleus neurons to stimulation of the middle meningeal artery and sagittal sinus. *J Neurophysiol* 1988;59:648–666.

Dawson H, Welch K, Segal MB. *The Physiology and Pathophysiology of Cerebrospinal Fluid.* New York: Churchill Livingstone, 1987: 64–188

Dawson DA, Kusumoto K, Graham DI, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis does not reduce infarct volume in a rat model of focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 1992; 142: 151–4.

Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6: 299-324

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical nitric oxide. *Ann Neurol* 1993;32: 297-311

de Lissovoy G, Lazaros SS. The economic cost of migraine. Present state of knowledge. *Neurology* 1994; 44(suppl 4): 556-562

Degnim AC, Morrow SE, Ku J, Nakayama DK. Nitric oxide inhibits peroxidase-mediated endothelial cell toxicity. *J Surg Res* 1998; 75: 127-134.

Deguchi T, Yoshioka M. L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1982; 257: 10147-52.

Deguchi T. Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosome-soluble fraction of ox brain. *J Biol Chem* 1977; 252: 7617-7619.

Dimitriadou V, Buzzi MG, Moskowitz MA, Theoharides TC. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. *Neuroscience* 1991; 44: 97-112

Dimitriadou V, Buzzi MG, Theoharides TC, Moskowitz MA. Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. *Neuroscience* 1992;48:187-203.

Dorhn CS, Beitz AJ. NMDA receptor mRNA expression in NOS-containing neurons in the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 1994; 175: 28-32

Dostrovsky JO, Strassman AM. Central transmission of cephalic pain. In: Olesen J, Tfelt-Hansen P, Welch KMA, eds. *The Headaches.* Second edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000,107-115.

Dux E, Jo T. Effect of histamine on brain capillaries. Fine structural and immuno-histochemical studies after intracarotid infusion. *Exp Brain Res* 1982; 47: 252-8

Ebersberger A, Ringkamp M, Reeh PW, Handwerker HO. Recordings from brain stem neurons responding to chemical stimulation of the subarachnoid space. *J Neurophysiol* 1997;77:3122-3133.

Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in the cerebral circulation: relevance to headache. *Cephalalgia* 1995; 15: 265-71

Eisenberg HM, Suddith RL. Cerebral vessels have the capacity to transport sodium and potassium. *Science* 1979; 206: 1083-6

Fabricius M, Rubin I, Bundgaard M, Lauritzen M. NOS activity in brain and endothelium: relation to hypercapnic rise of cerebral blood flow in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: H2035-44

Faraci FM, Brian JE. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 1994; 25: 692-703

Faraci FM, Heistad DD. Endothelium-derived relaxing factor inhibits constrictor responses of large arteries to serotonin. *J Cerab Blood Flow Metab* 1992; 12: 500-6

Faraci FM. Role of endothelium-derived relaxing factor in cerebral circulation: Large arteries vs. microcirculation. *Am J Physiol* 1991a;261: H1038-42.

Faraci FM. Role of nitric oxide in regulation of basilar artery tone in vivo. *Am J Physiol* 1991; 259: H1216-21.

Feldman PL, Griffith OW, Hong H, et al. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-N^G-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J Med Chem* 1993; 36; 491-6.

Ferguson AV, Bains JS. Electrophysiology of the circumventricular organs. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1996; 17: 440-75

Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, van Kempen GMJ, Pennings EJM, Bruyn GW (1989). Serotonin metabolism in migraine. Neurology 39: 1239-42

Ferrari MD, Saxena PR. On migraine and serotonin: a clinical and pharmacological review. Cephalalgia 1993; 13: 151-65

Fishman RA. Blood-brain barrier. In Fishman RA. *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1992: 43-69

Forstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, et al. Regional distribution of EDRF/NO synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 727-32.

Fozard JR. The 5-hydroxytryptamine-nitric oxide connection: the key link in the initiation of migraine? *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995;329:111-119.

Gao WC, Qiao JT. Nitric oxide contributes to both spinal nociceptive transmission and its descending inhibition in rats: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 1998;240:143-6.

Garthwaite G, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336: 385-8.

Go KG. The normal and pathological physiology of brain water. *Adv Techn Stand Neurosurg* 1997; 23:47-142

Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol* 1988; 23: 193-196.

Goadsby PJ, Edvinsson L. Extrinsic innervation: transmitters, receptors and functions - the sympathetic nervous system, the parasympathetic nervous system and the trigeminovascular system. In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases.* San Diego: Academic Press, 1997: 60-9

Goadsby PJ, Hoskin KL. Inhibition of trigeminal neurons by intravenous administration of the serotonin (5-HT) 1B/D receptor agonist zolmitriptan (311C90): are brain stem sites therapeutic target in migraine? *Pain* 1996;67:355-359.

Goadsby PJ, Hoskin KL. Differential effects of low dose CP122,288 and eletriptan on Fos expression due to stimulation of the superior sagittal sinus in cat. *Pain* 1999;82:15-22.

Goadsby PJ, Zagami AS, Lambert GA. Neural processing of cranial vascular pain: a synthesis of the central structures involved in migraine. *Headache* 1991;31:365-371.

Gobel S, Falls WR, Hockfield S. The division of the dorsal and ventral horns of the mammalian caudal medulla into eight layers using anatomical criteria. In: Anderson DJ, Matthews B, eds. *Pain in the Trigeminal Region.* New York: Elsevier, 1977:443-453.

Goldstein GW, Betz AL. Blood vessels and the blood-brain barrier. In: Asbury AK, McKhann GM, McDonald WI, editors. *Disease of the Nervous System, Clinical Neurobiology* 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders, 1992: 111-22

Goldstein GW, Betz AL. The blood-brain barrier. *Sci Am* 1986; 255: 70-9

Goldstein GW. Relation of potassium transport to oxidative metabolism in isolated brain capillaries. *J Physiol* 1979; 286:285-96

Gotoh F, Fukunchi Y, Amano T, et al. Role of endothelium in responses of pial vessels to change in blood pressure and to carbon dioxide in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7(Suppl 1): S275.

Govitrapong P, Limthavon C, Srikistkhachorn A. 5-HT_2 Serotonin receptor on blood platelet of migraine patients. *Headache* 1992; 32: 480-4

Griffith OW. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: Cell-type selective inhibition by N^{G}-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 96-103.

Griffiths LR, Nyholt DR, Curtain RP, Goadsby PJ, Brimage PJ. Migraine association and linkage studies of an endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene polymorphism. *Neurology* 1997;49:614-617.

Guevera-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 1994; 62: 807-10

Guilbaud G, Bernard JF, Besson JM. Brain areas involved in nociception and pain. In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of Pain*. Edinburgh: Churchill Linvingstone, 1994:113-128.

Hannah P, Jarman J, Glover V, Sandler M, Davies PTG, Clifford Rose F. Kinetics of platelet 5-hydroxytrptamine uptake in headache patients. *Cephalalgia* 1991;11: 141-5

Hara H, Zhang G-J, Kuroyanagi T, Kobayashi S. Parasympathetic cerebrovascular innervation: an anterograde tracing from the sphenopalatine ganglion in the rat. *Neurosurgery* 1993; 32: 822-7

Hardebo JE. Activation of pain fibers to the cranial artery intracranially may cause the pain and local signs of reduced sympathetic and enhanced parasympathetic activity in cluster headache. *Headache* 1991; 31: 314-20

Harder DR. Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium. *Circ Res* 1987; 60: 102-7

Hayashi H. Morphology of terminations of small and large myelinated trigeminal primary afferent fibers in the cat. *J Comp Neurol* 1985;240:71-89.

Hazama F, Amano S, Ozaki T. Pathological changes of cerebral vessel endothelial cells in spontaneously hypertensive rats, with special reference to the role of these cells in the development of hypertensive cerebrovascular lesions. *Adv Neurol* 1978; 20: 359-369

Heistad DD, Faraci FM. Gene therapy for cerebral vascular disease. *Stroke* 1996; 27: 1688-93

Henry MA, Johnson LR, Neusck-Gocbl NA, Westman LE. Light microscopic localization of calcitonin gene-related peptide in the normal feline trigeminal system and following rerogasserian rhizotomy. *J Comp Neurol* 1996;365:526-540.

Hess DC, Sheppard JC, Adams RJ. Increased immunoglobulin binding to cerebral endothelium in patients with antiphospholipid antibodies. *Stroke* 1993; 24: 994-9

Hidaka K, Mitsuyama T, Furuno T, Tanaka T, Hara N. The role of nitric oxide in human pulmonary artery endothelial cell injury mediated by neutrophils. *Int Arch Immunol* 1997, 114: 336-342.

Hino A, Tokuyama Y, Weir B, Takeda J, Yano H, Bell GI, Macdonald RL. Changes in endothelial nitric oxide synthase mRNA during vasospasm after subarachnoid hemorrhage in monkeys. *Neurosurgery* 1996; 39: 562-7

Hirakawa K, Uekusa K, Sato S, Nihira M. MRI and MRS studies on acute effects of ethanol in the rat brain. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1994;48:63-74.

Hoskin KL, Kaube H, Goadsby PJ. Central activation of the trigeminovascular pathway in the cat is inhibited by dihydroergotamine. A c-fos and electrophysiological study. Brain 1996, 119: 249-56

Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). I Responses to oral-facial noxious and nonnoxious stimuli and projections to thalamus and subnucleus oralis. *J Neurophysiol* 1981;45:173-192.

Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 981-7

Huang Z, Huang PL, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bavan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-42

Hunt SP, Mungiani R. Molecular markers of nociception. In: J. Olsen and MA Moskowitz (eds) *Frontiers in Headache Research*, volume 5: Experimental headache models, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1995: 39-48

Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link ? *Trends Neurosci* 1993; 16: 206-14

Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997; 20: 132-9

Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA. Nitric oxide synthe inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 175-92

Iadecola C, Zhang F, Xu X. Role of nitric oxide synthase-containing vascular nerves in cerebrovasodilation elicited from cerebellum. *Am J Physiol* 1993; 264: R738-46

Irikura K, Huang PL, Ma J, Lee WS, Dalkara T, FishmanMC, Dawson TM, Snyder SH, Moskowitz MA. Cerebrovascular alterations in mice lacking neuronalnitric oxide synthase gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6823-7

Ito A, Egashira K, Kodokami T, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nakaike R, Kuga T, Suetshi K, Shimokawa H, Takeshita A. Chronic inhibition of endothelium-derived nitric oxide synthase causes coronary microvascular structural changes and hyperactivity to serotonin in pigs. *Circulation* 1995; 92: 2636-44

Iversen HK. *N*-acetylcysteine enhances nitroglycerin-induced headache and cranial arterial responses. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52: 125-33

Iversen HK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. Intravenous nitroglycerine as an experimental model of vascular headache. Basic Characteristics. *Pain* 1989; 38: 17-24

Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6369-73.

Jacquin MF, Barcia M, Rhoades RW. Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris. IV. Projection neurons. *J Comp Neurol* 1989;282:45-62.

Jacquin MF, Chiaia NL, Haring JH, Rhoades RW. Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosens Motor Res* 1990;7:399-420.

Jacquin MF, Renehan WE, Mooney RD, Rhoades RW. Structure-function relationships in rat medullary and cervical dorsal horns. I. Trigeminal primary afferents. *J Neurophysiol* 1986;55:1153-1186.

Kitinic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries. *Am J Physiol* 1987; 252: H671-3.

Kaube H, Hoskin KL, Goadsby PJ. Activation of the trigeminovascular system by mechanical distension of the superior sagittal sinus in the cat. *Cephalalgia* 1992;12:133-136.

Kaube H, Keay KA, Hoskin KL, Bandler R, Goadsby PJ. Expression of c-Fos-like immunoreactivity in caudal medullar and upper cervical spinal cord following stimulation of the superior sagittal sinus in the cat. *Brain Res* 1993;629:95-102.

Kausalya S, Nath J. Interactive role of nitric oxide and superoxide anion in neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 185-191.

Keller JT, Bednk A, Saunders MC. Origin of fibers innervating the basilar artery of the cat. *Neurosci Lett* 1981;58:263-268.

Kelly PA, Ritchie IM, Collins FM. Cerebrovascular consequences of repeated exposure to NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2771-2777.

Kenshalo DR, Isensee O. Responses of primate SI cortical neurons to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 1983;50:1479-1496.

Kerr FWL. The ultrastructure of the spinal tract of the trigeminal nerve. *Exp Neurol* 1966; 16: 359-376.

Kimball RW, Friedman AP, Vallejo E. Effect of serotonin in migraine patients. *Neurology* 1960; 10: 107-11.

Kimmel DL. Innervation of spinal dura mater and dura mater of the posterior fossa. *Neurology* 1961;11:800-809.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5159-62.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, et al. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem J* 1990;269: 207-10.

Keyhar-Cüllik E, Vecsei L. Effect of a nitric oxide donor on nitroxergic nerve fibers in the rat dura mater. *Neurosci Lett* 1999 ; 260:97-100.

Kodokami T, Egashira K, Kuwata K, Fukumoto Y, Kozai T, Yasutake H, Kuga T, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Altered serotonin receptor subtypes mediate coronary microvascular hyperactivity in pigs with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation* 1996; 94: 182-9.

Komatsu S, Panes J, Russell JM, Anderson DC, Mozykantov VR, Miyasaka M, Granger DN. Effects of chronic arterial hypertention on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertention* 1997; 29:683-9.

Kovach AGB, Szabo C, Benyo Z, et al. Effect of N^G-nitro-L-arginine and L-arginine on regional cerebral blood flow in the cat. *J Physiol* 1992; 449: 183-96.

Kovacs K, Bors L, Tothfalusi L, Jelencsik I, Bozzik G, Karenui L, Komely S (1989). Cerebrospinal fluid (CSF) investigations in migraine. Cephalalgia 9: 53-7.

Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J-L, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; 9: 1277-1287.

Krum JM. Effect of astroglial degeneration on neonatal blood-brain barrier marker expression. *Exp Neurol* 1996; 142:29-35.

Kwan AL, Solteski NJ, Kassell NF, Lee KS. Inhibition of nitric oxide generation and lipid peroxidation attenuates hemolysate-induced injury to cerebrovascular endothelium. *Acta Neurochir* 1997; 139: 247-248.

Lambert GA, Lovy AJ, Bours PM, Angus-Leppan H, Zagami AS. The spinal cord processing of input from the superior sagittal sinus: pathway and modulation by ergot alkaloids. *Brain Res* 1992;597:321-330.

Lambert LE, Whitten JP, Baron BM, et al. Nitric oxide in the CNS, endothelium and macrophages differs in its sensitivity to inhibition by arginine analogues. *Life Sci* 1991; 48: 69-75.

Lenz FA, Dostrovsky JO, Tasker RR, Yamashiro K, Kwan HC, Murphy JT. Single unit analysis of the human ventral thalamic nuclear group: somatosensory responses. *J Neurophysiol* 1983;76:292-296.

Lindsberg PJ, Carpen O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg ML, Kaste M. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 1996; 94: 939-45.

Loftus CM, Biller J. Acute cerebral ischemia. Part I: pathophysiology and medical treatment. *Contemp Neurosurg* 1994; 16:1-6

Longmore J, Shaw D, Smith D, et al. Differential distribution of $5HT_{1D}$- and $5HT_{1F}$-immunoreactivity within the human trigemino-cerebrovascular system: implications for the discovery of new antimigraine drugs. *Cephalalgia* 1997;17:833;842.

Lorrain DS, Hull EM. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport* 1993; 5: 87-9

Lossinsky AS, Vorbrodt AW, Wisniewski HM. Scanning and transmission electron microscopic studies of microvascular pathology in the osmotically impaired blood-brain barrier. *J Neurocytol* 1995; 24: 795-806.

Magistretti PJ. Coupling of cerebral blood flow and metabolism. In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesj BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press, 1997: 70-4

Malick A, Burstein R. Cells of origin of trigeminohypothalamic tract in the rat. *J Comp Neurol* 1998;400:125-144.

Mantle St. John LA, Tracey DJ. Somatosensory nuclei in the brainstem of the rat: independent projections to the thalamus and cerebellum. *J Comp Neurol* 1987;255:259-271.

Marfurt CF, Rajchert DM. Trigeminal primary afferent projections to "non-trigeminal" areas of the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1991;303:489-511.

Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma proteins occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci* 1987;7:4129-36.

Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-8711.

May A, Kaube H, Buchel C, et al. Experimental cranial pain elicited by capsaicin: a PET study. *Pain* 1998;74:61-66.

Mayberg MR, Nicholas TZ, Moskowitz MA. Trigeminal projections to supratentorial pial and dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol* 1984;223:46-56.

McCall T, Vallance P. Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trend Pharmacol Sci* 1992; 13: 1-6.

McCarron RM, Wang L, Stern AL, Spatz M, Hallenbeck JM. Adhesion molecules on normotensive and hypertensive rat brain endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205: 257-62

McMahon SB, Lewin GR, Wall PD. Central hyperexcitability trigger by noxious input. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:601-610.

Messlinger K, Burstein R. Anatomy of central nervous system pathways related to head pain. In: Olesen J, Tfelt-Hansen P, Welch KMA, eds. *The Headache*. Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000:77-86.

Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 75: 851-6.

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NH, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835-46.

Miller KJ, Hoffman BJ. Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitricoxide and cGMP. *J Biol Chem* 1994;269: 27351-6.

Mombouli JV, Nephtali M, Vanhoutte PM. Effects of the converting enzyme inhibitor cilazapril on endothelium-dependent responses. *Hypertension* 1991; 18 (Suppl 11): 22-9.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42

Nagy Z, Kolev K, Csonka E, Pek M, Machovich R. Contraction of human brain endothelial cells induced by thrombogenic and fibrinolytic factors. An in vitro cell culture model. *Stroke* 1995; 26: 265-70

Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, et al. Effect of removal of the endothelium on vasoconstriction in canine and rabbit basilar arteries. *J Neurosurg* 1988; 68: 757-66.

Nozaki K, Boccalini P, Moskowitz MA. Expression of c-fos-like immunoreactivity in brain stem after meningeal irritation by blood in the subarachnoid space. *Neuroscience* 1992a; 49:669-680.

Nozaki K, Moskowitz MA, Boccalini P (1992b). CP-93,129, sumatriptan, dihydroergotamine block c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis caused by chemical irritation of the meninges. Br J Pharmacol 106: 409-15

Nozaki K, Moskowitz MA, Boccalini P. CP-93,129, sumatriptan, dihydroergotamine block c-fos expression within rat trigeminal nucleus dorsalis caused by chemical stimulation of the meninges. *Br J Pharmacol* 1992b;106:405-415

Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH (1993). Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase containing nerve fibers in rat and human cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13: 70-9

Nozaki K, Uemura Y, Okamoto S, Kikuchi H, Mizuno N. Origins and distribution of cerebrovascular nerve fibers showing calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the major cerebral artery of the dog. *J Comp Neurol* 1990;297:219-226

Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport* 1993;4:1027-1030

Olesen J, Thompsen LL, Lassen LH. The Possible involvement of nitric oxide in migraine. In: F. Clifford Rose (editor) *Towards Migraine 2000*. Elsevier Science, Amsterdam 1996; 111-27

Olszewski J. On the anatomical and functional organization of the trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 1950; 92: 401-413

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, Frants RR, Ferrari M. Involvement of a Ca^{2+} channel gene in familial hemiplegic migraine and migraine without aura. *Headache* 1997;37:479-483.

Palmer RMJ, Moncada SA. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 348-52.

Pantoni L, Garcia JH. Pathogenesis of leukoaraiosis. A review. *Stroke* 1997; 28: 652-9

Pelligrino DA, Koenig HM, Albrecht RF. Nitric oxide synthesis and regional cerebral blood flow responses to hypercapnia and hypoxia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 80-7.

Phanthumchinda K, Suhs-Amorn C. Prevalence and clinical features of migraine: A community survey in Bangkok. *Headache* 1989;29: 594-7

Pogun S, Baumann MH, Kuhar MJ. Nitric oxide inhibits [^{3}H]dopamine uptake. *Brain Res* 1994; 641: 83-91

Price DD, Dubner R, Hu JW. Trigeminothalamic neurons in nucleus caudalis responsive to tactile, thermal, and nociceptive stimulation of monkey's face. *J Neurophysiol* 1976;39:936-953.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991 (a); 266: 4244-4250.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. The cytotoxic potential of supeoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991(b); 288: 481-487.

Rajamani K, Fisher M. An overview of atherosclerosis. In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press, 1997: 145-8

Ray BS, Wolff HG. Experimental studies on headache: pain sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg* 1940;1:813-856.

Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Parsons AA. Enhanced nitric oxide release during cortical spreading depression following infusion of glyceryl trinitrate in the anaesthetized cat. *Cephalalgia*. 1997;17:159-165.

Renehan WE, Jacquin MF, Mooney RD, Rhoades RW. Structure-function relationships in rat medullary and cervical dorsal horns. II. Medullary dorsal horn cells. *J Neurophysiol* 1986;55:1187-1201.

Rivest PA, Jones HC, Abbott NJ. Transendothelial electrical potential across pial vessels in anesthetised rat: A study of ion permeability and transport at the blood-brain barrier. *Brain Res* 1994; 652: 76-82

Roberts GW, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108: 2369-79

Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R. Expression of NADPH-diaphorase and colocalization with Fos in the brain neurons of the rat following visceral noxious stimulation. *Brain Res* 1999 Jul 10;834 (1-2):173-7.

Romansky K, Stamenov B. Ultrastructural study of cerebral cortex and subcortical white matter following ligation of bridging veins in cats. *Zentralbl Neurochir*. 1995;56:111-116.

Roon KI, Olesen J, Diener HC, Ellis P, Hettiarachchi J, Poole PH, Christiansen I, Kleinermans D, Kok JG, Ferrari MD. No acute antimigraine efficacy of CP-122,288, a highly potent inhibitor of neurogenic inflammation: results of two randomized double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Ann Neurol* 2000;47:238-41.

Rosenblum WI, Nishimura H, Nelson GH. Endothelium dependent L-arg-and L-NMMA-sensitive mechanisms tone of brain microvessels. *Am J Physiol* 1990; 259: H1396-401

Ross R. Factors influencing atherogenesis. In Schlant RC, Alexander RW, O'Rourke RA, Roberts R, Sonnenblick EH, editors. *Hurst's The Heart: Arteries and Veins*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 1994: 989-1008

Rubanyi GM,Freay AD, Kauser K, Johns A, Harder DR. Mechanoreception by the endothelium: Mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular response. *Blood Vessels* 1990; 27: 246-57

Sakai F, Mayer JS. Regional cerebral hemodynamics during migraine and cluster headache measured by the ^{133}Xe inhalation method. *Headache* 1978; 18: 122-32

Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997; 28: 1283-8

Sarchielli P, Tognoloni M, Russo S, Vulcano MR, Feleppa M, Mala M, Sartoli M, Gallai V. Variations in the platelet arginine/nitric oxide pathway during the ovarian cycle in females affected by menstrual migraine. *Cephalalgia*. 1996;16:468-475.

Schilling L, Wahl M. Brain edema: Pathogenesis and therapy. *Kidney Int* 1997; 51 (Suppl 59): S69-75

Sessle BJ. Neurophysiology of orofacial pain. *Dent Clin North Am* 1987;31:593-613

Shen YH, Wang XL, Wilcken DL. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett* 1997; 433: 125-131.

Shimizu S, Nomoto M, Naito S, Yamamoto T, Momose K. Stimulation of nitric oxide synthase during oxidative endothelial cell injury. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 77-83.

Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum level of intecellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol* 1997; 244: 90-3

Sicuteri F, Nicolodi M. Fibromyalgia (alias central panalgia): the severest expression of dysnociception. Proceeding of the XI Migraine Trust International Symposium, London, 1997; p 18

Sicuteri F, Testi A, Anselmi B. Biochemical investigation in headache: increase in hydroxyindoleacetic acid excretion during migraine atack. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1961;19: 555-8

Snyder SH, Bredt DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 125-8.

Srikiatkhachorn A, Anthony M. Platelet serotonin in patients with analgesic-induced headache. *Cephalalgia* 1996a;16: 423-6

Srikiatkhachorn A, Anthony M. Serutonin receptor adaptation in patients with analgesic-induced headache. *Cephalalgia* 1996b; 16: 419-22

Srikiatkhachorn A, Govitrapong P, Limthavon C. Up-regulation of 5-HT2 serotonin receptor: a possible mechanism of transformed migraine. *Headache* 1994; 34: 8-11

Srikiatkhachorn A, Mancesri S, Govitrapong P, Kasantikul V. Derangement of serotonin system in migrainous patients with analgesic abuse headache. *Headache.* 1998;38:43-49.

Staniszewic D, Shapiro A, Wong J, Hutchison J, Durkin J. The induction of ICAM-1 on human cerebromicrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion. *J Neuroimmunol* 1997; 76: 193-205

Stepien A, Chalimoniuk M, Strosznajder J. Serotonin 5-HT$_{1a/1b}$ agonists abolish NMDA-evoked enhancement of nitric oxide synthase and cGMP concentration in brain cortex slices. *Cephalalgia.* 1999;19:859-65.

Stewart PA. Glial-vascular relations.In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases.* San Diego: Academic Press, 1997: 17-21

Strassman AM, Burstein R. Trigeminal mechanisms of vascular head pain. In: Olesen J, Moskowitz MA (eds) *Frontiers in Headache Research*, volume 5: Experimental headache models, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1995: 207-16

Strassman AM, Mason P, Moskowitz MA, Maciewicz RJ. Response of brainstem trigeminal neurons to electrical stimulation of the dura. *Brain Res* 1986;379:242-250.

Strassman AM, Messlinger K, Burstein R. Peripheral activation and sensitization of nociceptors. In: Olesen J, Tfelt-Hansen P, Welch KMA (editors). *The Headaches.* Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000: 99-103.

Strassman AM, Potrebic S, Maciewicz RJ. Anatomical properties of brainstem trigeminal neurons that response to electrical stimulation of dural blood vessels. *J Comp Neurol* 1994;346:349-356.

Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 1996;384:560-564.

Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, et al. N^{ω}-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991; 266: 6259-65.

Talman WT, Dragon DN. Mechanisms for preserved cerebrovascular autoregulation during hypertension in rats after sinoaortic denervation. *Clin Exper Pharmacol Physiol* 1995; 22 (Suppl 1): S77-9.

Tashiro T, Takahashi O, Satoda T, Matsushima R, Uemura-Sumi M, Mizuno N. Distribution of axons showing calcitonin gene-related peptide- and/or substance P-like immunoreactivity in the sensory trigeminal nuclei of the cat. *Neurosci Res* 1991;11:119-133.

Tassorelli C, Joseph SA. NADPH-diaphorase activity and Fos expression in brain nuclei following nitroglycerin administration. *Brain Res* 1995 Oct 9;695(1):37-44.

Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res* 1995 Jun 5;682(1-2):167-81.

Thompsen LL, Iversen HK, Brinck TAL, Olesen J. Arterial hypersensitivity to nitric oxide (nitroglycerin) in migraine sufferers. *Cephalalgia* 1993; 13: 395-9

Thomsen LL, Krause C, Iversen HK, Olesen J. A nitric oxide donor (nitroglycerin) triggers genuine migraine attacks. *Eur J Neurol* 1994; 1: 73-80

Thomsen LL, Brennum J, Iversen HK, Olesen J. Effect of a nitric oxide donor (glyceryl trinitrate) on nociceptive thresholds in man. *Cephalagia* 1996;16:169-174.

Toda A, Okamura T. Different susceptibility of vasodilator nerve, endothelium and smooth muscle functions to Ca^{2+} antagonists in cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 234-239.

Toda N, Okamura T. Possible role of nitric oxide in transmitting information from vasodilator nerve to cerebroarterial muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170: 308-13

Toole JF. Brain infarction. In Toole JF. *Cerebrovascular Disorders*. New York. Raven Press 1990; 227-307

Trezise DJ, Drew GM, Weston AH. Analysis of the depressant effect of the endothelium on contractions of rabbit isolated basilar artery to 5-hydroxy-tryptamine. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 587-592.

Uddman R, Edvinsson L, Ekman R, et al. Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci Lett* 1985;62:131-136.

Wang H, Nie H, Zhang RX, Qiao JT. Peripheral nitric oxide contributes to both formalin- and NMDA-induced activation of nociceptors: An immunocytochemical study in rats. *J Neurosci Res* 1999;57:824-8.

Wang Q, Pelligrino DA, Baughman VL, et al. The role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of cerebral blood flow in normocapnia and hypercapnia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 774-8.

Wang Q, Pelligrino DA, Koenig HM, Albrecht RF. The role of endothelium and nitric oxide in rat pial arteriolar dilatory responses to CO_2 in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 944-51

Wang W, Merrill MJ, Borchardt RT. Vascular endothelial growth factor affects permeability of brain microvessel endothelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1996; 271: C1973-80

Wang X, Feuerstein GZ. Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. *J Neurotrauma* 1995; 12:825-32

Wei EP, Dietrich WD, Povlishock JT. Functional, morphological and metabolic abnormality of the cerebral microcirculation after concussive brain injury in cats. *Circ Res* 1980; 46: 37-47.

Weiller C, May A, Limmroth V, et al. Brainstem activation in spontaneous migraine attacks. *Nat Med* 1995;1:658-660.

Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 551-61

Willis WD. Nociceptive functions of thalamic neurons. In: Steriade M, Jones EG, McCormick DA, eds. *Thalamus*. Vol. II Experimental and clinical aspects. Oxford, England: Elsevier, 1997:373-424.

Wintour EM. Water channels and urea transporters. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 241-9

Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell CL, Risau W. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocyte. *J Cell Sci* 1994; 107: 1347-57

Wolff HG. *Headache and Other Head Pain*. New York, Oxford University Press, 1989

Woolf CJ, Doubell TP. The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold Aβ-fibre input. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:525-534.

Woolf CJ, King AE. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurones in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990;10:2717-2726.

Woolf CJ, Wall PD. The relative effectiveness of C primary afferent fibres of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurophysiol* 1986;6:1433-1443.

Wotherspoon G, Albert M, Rattray M, Priestley JV. Serotonin and NADPH-diaphorase in the dorsal raphe nucleus of the adult rat. *Neurosci Lett* 1994; 173: 33-6

Yang ST. Role of nitric oxide in the maintenance of resting cerebral blood flow during chronic hypertension. *Life Sci* 1996; 58: 1231-8.

Yokata T, Koyama N, Matsumoto N. Somatotopic distribution of trigeminal nociceptive neurons in ventrobasal complex of cat thalamus. *J Neurophysiol* 1985;53:1387-1400.

Yokata T, Matsumoto N. Somatotopic distribution of trigeminal nociceptive specific neurons within in the caudal somatosensoty thalamus of cat. *Neurosci Lett* 1983;39:125-130.

Yokata T, Nishikawa N. Reappraisal of somatotopic tactile representation within trigeminal subnucleus caudalis. *J Neurophysiol* 1980;43:700-712.

Young RF. The trigeminal nerve and its central pathway. In: Rovit RL, Murali R, Jannetta PJ, eds. *Trigeminal Neuralgia*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1990:27-51.

Zagami AS, Lambert GA. Stimulation of cranial vessels excites nociceptive neurones in several thalamic nuclei of the cat. *Exp Brain Res* 1990;81:552-566.

RESEARCH OUTPUT

Publication and Scientific Paper Presentation

ภาคผนวก: การเผยแพร่ผลงาน

คณะผู้วิจัยได้ทำการเผยแพร่ความรู้ที่ได้จากการศึกษา ดังนี้

การตีพิมพ์บทความทางวิชาการ ได้ตีพิมพ์บทความทางวิชาการ ดังนี้

1. Anuntaseehakul T, Srikiatkhachorn A, Mancosi S, Patumraj S, Kasantikul V. Ultrastructural changes in endothelial cells of cerebral microvessels after exposure to nitric oxide donor. *Neuropathology* 1999;19:249-58.

2. Srikiatkhachorn A, Anuntaseehakul T, Mancosi S, Phansuwan-Pujito P, Patumraj S, Kasantikul V. Hyposerotonin-induced nitric oxide supersensitivity in the cerebral microcirculation. *Headache* 2000;40:267-75.

3. Srikiatkhachorn A, Anuntaseehakul T, Patumraj S, Kasantikul V. Can hyposerotonin be the cause of nitric oxide supersensitivity in migraine? *Cephalalgia* 1999;19:342-3.

4. Srikiatkhachorn A, Anuntaseehakul T, Phansuwan-Pujito P, Patumraj S, Kasantikul V. Depletion of Serotonin Enhances Meningeal Vascular Response to Nitric Oxide, but Not Fos Expression in Brainstem Neurons. (In preparation)

การนำเสนอผลงาน

1. นำเสนอผลงานเรื่อง "Nitric Oxide Induced Vascular Responses in Pial Microcirculation" ในการประชุมวิชาการร่วมระหว่างมหาวิทยาลัยวิจัยยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ National Cardiovascular Research Institute of Japan ณ. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อเดือนตุลาคม 2541

2. นำเสนอผลงานเรื่อง "Roles of nitric oxide and serotonin in the control of cerebral circulation" ในการประชุมวิชาการ Japan-Thai Joint Meeting on "Pathophysiology of Circulatory Disorders in Views of Microvascular Science" ที่นครโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น เมื่อวันที่ 28 มกราคม 2542

3. นำเสนอในลักษณะการบรรยายทางวิชาการเรื่อง "Cerebral circulation and pathogenesis of vascular headache: Roles of serotonin and nitric oxide" ในการประชุมวิชาการครั้งที่ 1 ของสมาคมแพทยศาสตร์ศีรษะแห่งประเทศไทย เมื่อวันที่ 5 มีนาคม 2542

4. นำเสนอในลักษณะการบรรยายทางวิชาการเรื่อง "Migraine: The New Physiological Trends" ในการประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 40 ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อวันที่ 22 มีนาคม 2542

5. นำเสนอผลงานเรื่อง "Can hyposerotonin be the cause of nitric oxide supersensitivity in migraine?" ในการประชุมวิชาการของ International Headache Society ที่นครบาร์เซโลนา ประเทศสเปน เมื่อวันที่ 24 มิถุนายน 2542

6. นำเสนอในลักษณะการบรรยายทางวิชาการ เรื่อง "Altered Serotonergic Neurotransmission as a Mechanism of Migraine Pathogenesis" ในการประชุม Molecular Biology Club ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อวันที่ 22 ธันวาคม 2542

7. เสนอผลงานเรื่อง "Depletion of Serotonin Enhances Meningeal Vascular Response to Nitric Oxide, but Not Fos Expression in Brainstem Neurons" ในการประชุมวิชาการ Headache World 2000 จัดโดย The Migraine Trust (London), the International Headache Society, the American Headache Society และ the European Headache Society ที่นครอดินบรา ประเทศสหราชอาณาจักร เมื่อวันที่ 4-8 กันยายน 2543

รางวัลที่ได้รับ

1. Best Basic Research Poster Presentation จากการประชุมวิชาการ The Ninth Congress of the International Headache Society ที่นครนาโกยา ประเทศญี่ปุ่น เมื่อวันที่ 24 มิถุนายน 2542

Manuscript for publication:

Title:

Depletion of serotonin enhances meningeal vascular response to nitric oxide, but not Fos expression in brainstem neurons.

Depletion of serotonin enhances meningeal vascular response to nitric oxide, but not Fos expression in brainstem neurons.

Anan Sriklatkhachorn MD[1], Thirapom Anuntasethakul PhD[1], Pansiri Phansuwan-Pujito PhD[2], Suthiluk Patumraj PhD[1], Vira Kasantikul MD[3].

Departments of [1] Physiology and [3] Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 and [2] Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, THAILAND

Financial Support: Thailand Research Fund

ABSTRACT

OBJECTIVE. To investigate the effect of serotonin depletion on nitric oxide-induced meningeal vascular response and cerebrovascular nociception.

MATERIALS AND METHODS. Wistar rats were divided into control and serotonin-depleted groups (6 rats each). Depletion of serotonin was induced by intraperitoneal injection of para-chlorophenylalanine (300 mg/kg). Three days after pretreatment, rats were prepared for assessment of nitric oxide-induced pial vasodilatation using nitroglycerin (10 mg/kg) as a nitric oxide-donor. Pial circulation was monitored to the period of 60 minutes postinfusion using intravital fluorescein videomicroscopy. The cerebrovascular nociceptive response to nitroglycerin was studied using neuronal Fos immunoreactivity as an indicator.

RESULTS. Nitric oxide-induced pial microvascular dilatation was significantly greater in serotonin-depleted group than those measured in the control (P=0.026). Percentage changes from baseline diameter 60 minutes after nitroglycerin infusion were 68.4±4.7% and 45.5±4.7% for serotonin-depleted and control groups, respectively (P<0.001). Immunohistochemical study revealed that exposure to nitric oxide donor evoked Fos immunoreactivity in various brainstem nuclei. The numbers of Fos positive cells per five sections in serotonin-depleted and control groups were 162±6 and 154±8 in trigeminal nucleus caudalis, 250±27 and 258±29 in nucleus of solitary tract and 218±17 and 226±14 in lateral reticular nucleus. No significant difference in number of nitric oxide-evoked Fos-positive cells in any brainstem nuclei was evident when the two groups were compared.

CONCLUSIONS. Although depletion of serotonin can facilitate the vascular response to nitric oxide, it does not alter the nitric oxide-induced craniovascular nociceptive response as evident from the comparable number of Fos positive cells.

Key Words: migraine, serotonin, nitric oxide, cerebral circulation, Fos

Abbreviations: 5-HT serotonin, NO nitric oxide, NOS nitric oxide synthase, PCPA para-chlorophenylalanine, PPE plasma protein extravasation

INTRODUCTION:

Previous studies showed that migraine patients experience a delayed migraine-like headache in association with nitroglycerin, a nitric oxide (NO) donating compound, administration more often than do non-migraineurs.[1] This headache is preceded by an immediate headache response during nitroglycerin infusion, resembling but not fulfilling diagnostic criteria for International Headache Society's criteria for migraine without aura. Besides clinical headache, an increase in sensitivity to nitroglycerin-induced dilatation of large intracranial arteries was also evident in migraine patients.[2] Those clinical findings imply an increased NO sensitivity in migraine patients and lead to a NO supersensitivity hypothesis of migraine pathogenesis.[3] In accord with those clinical observations, the role for NO in mediating nociceptive transmission in acute migrainous attack is also supported by results from animal experiments. For instance, Hoskin et al showed that nociception-evoked Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat could be reduced by inhibition of NO synthesis.[4] The use of nitric oxide synthase (NOS) inhibitor as an abortive treatment for

migraine has been subjected to clinical trial and preliminary result showed its potentially beneficial effect.[5]

Though the involvement of NO in migraine pathogenesis has been widely recognised, mechanism underlying such supersensitivity to NO is still unknown. Intrinsic derangement in NO production system is unlikely since neither association of the NOS microsatellite nor linkage to migraine was demonstrated.[6] Such finding, therefore, did not support the role of this gene in migraine pathogenesis. An indirect mechanism via extraneous factors, e.g. derangement in other neurotransmitter systems, which can enhance cerebrovascular response to NO is another possible alternative explanation. Previously, we have shown that depletion of serotonin (5-HT) can facilitate the pial microvascular dilatation in response to intravenous nitroglycerin infusion.[7] In the present study, we employ an experimental model to investigate whether the depletion of 5-HT can enhance the craniovascular nociceptive response to exogenous NO. Brainstem neuronal Fos immunoreactivity was used as an indicator.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

Male Wistar rats, weighing 300-350 grams were divided into 5-HT depleted and control groups (six rats each). In the 5-HT depleted group, a single dose of 300 mg/kg of para-chloro-phenylalanine (PCPA), a tryptophan hydroxylase inhibitor was administered intraperitoneally three days prior to the experiment. This regimen can deplete the brain 5-HT to the level of less than 20% of normal.[8] Physiologic saline of the same volume was given to the control group. Three days after PCPA pretreatment, the animals were prepared for the assessment of NO-induced intracranial microvascular response using nitroglycerin as a NO-donating agent. The response of pial microcirculation to nitroglycerin was monitored *in vivo* by fluorescein videomicroscopic technique. To avoid the effect of surgical operation-induced Fos expression, another set of experiment was conducted to investigate the effect of 5-HT depletion on NO-evoked c-fos expression in brainstem neurons by using immunohistochemical method.

Surgical Preparation and Intravital Fluorescein Videomonitoring Technique

Rats were anesthetized for the duration of experiments by intraperitoneal administration of 50 mg/kg of sodium pentobarbital. Additional doses of anesthetics were given as required to maintain experimental process anesthesia based on testing of corneal reflex and response to tail pinch. Tracheostomy was performed and ventilation was assisted by a positive pressure ventilator (Rodent ventilator model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). A femoral artery and a femoral vein were canulated to record blood pressure and for infusion of drugs, respectively. Blood pressure was monitored throughout experiments with pressure transducer (Nikhon model TP-300T, Nihon Khoden, Tokyo, Japan) which recorded on a polygraph (Nikhon RM 6000, Nihon Khoden, Tokyo, Japan). Arterial blood was collected periodically for determination of pH, PaO_2 and $PaCO_2$ by a pH/blood gas analyzer (238 pH/blood gas analyzer, Ciba Corning Diagnostics, Essex, UK).

After tracheostomy and canulation had been performed, the rats were placed on a surgical frame and the head was securely positioned with a head holder. The frontal bone was removed by a saline-cooled drill to expose the superior sagittal sinus and the dura was then opened using a microneedle. A cranial window was placed over craniotomy site. An artificial cerebrospinal fluid was infused into the intracranial space. The fluorescein microscope (Optiphot 2, Nikon, Tokyo, Japan) fitted with the videomonitoring system (SIT Camera; SIT-MTI, Michigan, IN, USA) was installed. Fluorescein-isothiocyanate labeled dextran (FITC-Dx-150) (molecular weight 150,000) was injected intravenously to visualize the pial microvessels. Nitroglycerin (2 mg/kg/min) was given intravenously until the total dose of 10 mg/kg was reached. The images of pial microvessels at 0, 5, 15, 30 and 60 minutes post-infusion were recorded with the videosystem for frame by frame playback analysis. Pial vessels with baseline diameter between 10 to 30 Lm were selected for the measurement since these small arterioles are regarded as resistant vessels and play significant role in control of regional blood flow. Twenty vessels were randomly selected from each group of six

rats. Images of selected vessels were digitized and the diameters of those vessels were determined by using the computer program "Global Lab Image" (Data Translation, MA, USA).

Determination of NO-Evoked Fos-Immunoreactivity in Brainstem Neurons

To avoid the effect of surgery-induced Fos expression, the study for NO-induced Fos immunoreactivity was performed in the other set of experiment animals. The studied animals comprised two groups of male Wistar rats (six rats each). Serotonin was depleted by using the same method as in the previous experiment. Nitroglycerin (10 mg/kg) was infused intravenously within the period of 5 minutes. Two hours after nitroglycerin infusion, rats were humanely killed with excessive dose of pentobarbital. Rats were then perfused transcardially with 250 ml of phosphate buffer saline (pH 7.4). This was followed by 200 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The brain and cervical spinal cord were removed and stored overnight at 4° C in 0.1 M phosphate buffer solution. Tissues were then cryoprotected by immersing in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer solution at 4° C. Coronal sections (30 Πm) of the brainstem were cut on cryostat (Microm HM 505N, Walldorf, Germany) and every tenth sections were collected for further processing.

Free-floating sections were washed twice with potassium phosphate buffer solution containing 0.25% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 (KPBS-A). The sections were then pretreated in 1% hydrogen peroxide in KPBS-A for 10 minutes to reduce the endogenous peroxidase. Prior to incubation in the primary antiserum, the sections were incubated in 5% normal rabbit serum in KPBS containing 1% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100 (KPBS-B), for 30 minutes at room temperature. This was followed by the incubation in the specific antiserum against Fos protein (CHEMICON International, Temecula, CA, USA) for 48 hours at 4 °C. After washing three times in KPBS-A, the sections were then incubated with biotinylated anti-sheep IgG (CHEMICON International, Temecula, CA, USA) diluted 1:400 in KPBS-A for 60 minutes at room temperature and then were washed in KPBS-A for 3x10 minutes. The sections were treated with ABC-streptavidin horseradish peroxidase complex diluted 1:250 in KPBS-A for 1 hour. The sections were then washed sequentially in KPBS-A, KPBS, and 0.05 M TrisHCl buffer (pH 7.6) for 10 minute in each buffer. They were reacted for peroxidatic activity in a solution containing 0.025% diaminobenzidine (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.01% hydrogen peroxide in 0.05 M TrisHCl buffer solution (pH 7.6) for 15 minutes. Following the reaction, the sections were washed twice with distilled water and mounted onto gelatinized glass slides. Fos-immunoreactive (FosIR) cells were distinguished by their black nickel enhanced nuclei from the background. FosIR cells were plotted onto sections of the brainstem modified from the atlas of Paxinos and Watson.[8] Distribution of FosIR cells were quantified for each animal by taking five sections for each levels and plotting the label from each slide onto one schematic section. The number of FosIR cells were summed and expressed as cells per five slides.

Statistical Analysis

The nitroglycerin-induced effects on pial vessel diameter were calculated as the maximum percentage change from pre-dose baseline. All values were presented as mean±standard error of mean (SEM) and 95% confidence interval (95%CI). To compare serial changes in vessel diameter, analysis of variance (ANOVA) for repeated measurement with posthoc Bonferroni adjustment was employed. The number of Fos-IR cells in each brainstem nucleus was expressed as five sections median and interquartile range. Statistical differences among 5-HT depleted- and control groups were compared using Mann-Whitney test. All the statistical tests were performed using computer program SPSS version 9 for windows. Probability values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Pretreatment with PCPA showed a slight decrease in motor activity without significant changes concerning body weight or vital signs. All animals included in the analysis were successfully maintained within normal physiological limits throughout the studies. Infusion of nitroglycerin produced a transient decrease in systemic blood pressure with maximal change of 15%. The blood pressure rapidly became normalized after nitroglycerin was removed. No change in arterial pH, PaO_2 and $PaCO_2$ was evident after nitroglycerin infusion. Pretreatment

with PCPA did not cause significant difference in systemic arterial pressure as compared to those observed in nitroglycerin-infusion alone.

Effects of 5-HT Depletion on NO-Induced Pial Arteriolar Dilatation

Pial arteriolar dilatation was observed almost immediately after nitroglycerin infusion and reached its peak at 15 minutes and persisted for at least 60 minutes. The greatest difference was evident at 15 minute post-infusion with the magnitude of difference of 59.3±5.4 percent (95%CI = 48.4 to 70.2, P<0.001) and its effect began to decline after 30 minutes. Pretreatment with PCPA did not affect the basal diameters of pial arterioles but enhanced the vasodilating effect of nitroglycerin. A statistically significant increase in magnitude of nitroglycerin-induced pial arteriolar dilatation was observed in the immediate early and late phases. Percentage of changes of pial arteriolar diameter at minute 5 in PCPA-pretreated rats and controls were 36.4±4.1and 51.1±4.3%, respectively (magnitude of difference = 14.7±5.9%, 95%CI = 2.9 to 26.5, P=0.015). A greater difference was noted at late phase of monitoring (minute 60) with the magnitude of difference between PCPA-pretreatment and control groups of 22.9±6.7% (95%CI = 9.5 to 36.2, P<0.001) (Table 1 and Figure 1).

Effects of 5-HT Depletion on NO-Evoked Fos Immunoreactivity in Brainstem Neurons

Nitroglycerin evoked Fos expression in various areas of brainstem. In medullary nuclei, exposure to NO-donor produced a median of 140 (interquartile range 134-160) FosIR cells in trigeminal nucleus caudalis, 240 (interquartile range 188-262) in lateral reticular nucleus, 232 (interquartile range 166-398) in nucleus of solitary tract and 178 (interquartile range 98-202) in inferior olivary nucleus. In hypothalamus, FosIR cells were densely confined in the paraventricular and supraoptic nuclei. Considerable numbers of FosIR neurons were also demonstrated in amygdala and habenular nucleus. The distribution of FosIR cells reflects diverse variety of neurophysiological processes in response to NO, including sensory nociception, autonomic and neuro-endocrine functions.

Pretreatment with PCPA did not produce significant alteration in number of NO-evoked FosIR cells in any brainstem nuclei as compared with the control. The numbers of FosIR cells per five sections in 5-HT-depleted were 156 (interquartile range 136-164) cells in trigeminal nucleus caudalis (P = 0.851), 204 (interquartile range 168-286) cells in nucleus of lateral reticular nucleus (P = 0.878), 186 (interquartile range 154-374) in nucleus of solitary tract (P=0.724) and 154 (interquartile range 120-158) cells in inferior olivary nucleus (P = 0.092).

COMMENTS:

In this study, the 5-HT depleted state can enhance the effect of NO in inducing meningeal vasodilatation. In contrast to its effect on NO-induced vascular response, depletion of 5-HT fails to modulate the number of NO-evoked FosIR neurons in trigeminal nucleus caudalis, which in turn reflecting the absence of its effect on modulation of craniovascular nociception.

Accumulating evidences indicate the role of NO in nociceptive transmission and modulation. According to Wang *et al*, the numbers of both formalin- and NMDA-evoked FosIR cells in spinal dorsal horn could be reduced by co-injection with the NOS inhibitor at the injured sites.[10] These results suggest that endogenously generated NO may enhance the initiation of nociceptive inputs of peripheral nociceptors. In addition to its peripheral action, the roles of NO in nociceptive modulation in the central nervous system area also evidenced. For instance, the intrathecal administration of NOS inhibitor was shown to minimize the number of nociception-evoked Fos expression in spinal dorsal horn.[11] Co-localization of NADPH- diaphorase positive neurons and nociceptive responsive neurons in various brain areas also imply the roles of NO in nociceptive modulation at the supraspinal levels.[12]

In the context of vascular headaches, NO has been proposed to be the pain mediator in migraine and cluster headache. Clinically, exposure to NO-donating compounds can evoke headache in both patients with migraine and non-headache controls.[7] Furthermore, Christiansen *et al* showed that infusion of nitroglycerin could provoke headache, which fulfilled criteria for migraine without aura in patients with migraine with aura.[13] Their findings imply that NO can bypass the neuronal process that underlies the migraine aura and directly

stimulate the pain-sensitive structures in cranial cavity. In this study, we demonstrate that the administration of nitroglycerin can induced Fos expression in trigeminal nucleus caudalis neurons indicating the activation of cranial nociceptive pathway. The distribution of NO-evoked FosIR observed in this study supports previous findings of Tassorelli and Joseph.[14] Interestingly, it was shown that in some brain areas, the NO-evoked FosIR neurons are also NADPH-diaphorase-positive.[15] In addition, Knyihar-Csillik and Vecsei demonstrated the effect of exogenous administration of nitroglycerin in increasing beading of the NOS-immunoreactive nerve fiber in supratentorial dura mater.[16] These findings indicate that exogenous NO can activate NOS positive neurons resulting in endogenous production of NO. This proposed mechanism might explain prolong nitroglycerin-induced vasodilation demonstrated herein and may underlie the delayed NO-induced headache observed in migraine patients.

Multiple mechanisms orchestrate in control of NO production in the central nervous system. These complex mechanisms involve various types of chemical messenger, including 5-HT. Evidences have indicated that 5-HT can both facilitate and attenuate the process of NO production, depending on types of its receptor. In 1995, Fozard suggested that 5-HT, via activation of 5-HT_{2B}-5-HT_{2C} receptors on endothelial cells, might stimulate the release of NO.[17] In the contrary, it was shown that $5\text{-HT}_{1B/1D}$ agonists can abolished the NMDA-evoked enhancement of NOS activity and cGMP concentration.[18] Although we found the enhancing effect of 5-HT depletion on vascular response, we could not detect any significant changes in number of FosIR cells in brainstem. This contradiction may results from different 5-HT receptor types that play major roles in each process.

Pathophysiological alterations in cranial vessels, especially perivascular sterile neurogenic inflammation causing plasma protein extravasation (PPE), have been proposed to play a critical role in causing headache in migraine.[19] However, recent evidences showed that changes in cranial blood vessels and headache have no direct cause-effect relationship. According to Goadsby and Hoskin, the administration to CP122,288, a potent selective inhibitor of PPE, at the dose that blocks PPE has no effect on Fos expression in central trigeminal neurons after superior sagittal sinus stimulation.[20] The finding is in accord with subsequent clinical study. Roon et al demonstrated that CP-122,288 is not clinically effective at doses and plasma concentrations in excess of those required to inhibit PPE.[21] Therefore, PPE is unlikely to play crucial role in the pathogenesis of headache in migraine. The results of no association between vascular and neuronal response presented in this study further support such assumption.

In conclusion, depletion of 5-HT can facilitate the vasodilating response to NO but has no effect on NO-evoked Fos expression in nociceptive neuron. Therefore, depletion of 5-HT alone cannot fully explain the more severe headache observed in migraine patients after exposure to NO-donating agents.

ACKOWLEDGEMENT

The authors grateful acknowledge the Thailand Research Fund for their financial support to this research.

REFERENCES:

1. Thomsen LL, Kruuse C, Iversen HK, Olesen J. A nitric oxide donor (nitroglycerin) triggers genuine migraine attacks. *Eur J Neurol* 1994;1:73-80.

2. Thomsen LL, Iversen HK, Brinck TA, Olesen J. Arterial supersensitivity to nitric oxide (nitroglycerin) in migraine sufferers. *Cephalalgia* 1993;13:395-9.

3. Thomsen LL, Olesen J. A pivotal role of nitric oxide in migraine pain. *Ann NY Acad Sci* 1997;835:353-72.

4. Hoskin KL, Bulmer DC, Goadsby PJ. Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME. *Neurosci Lett* 1999;266:173-6.

5. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Grover R, Donaldson J, Olesen J. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle on the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia* 1998;18:27-32.

6. Griffiths LR, Nyholt DR, Curtain RP, Goadsby PJ, Brimage PJ. Migraine association and linkage studies of an endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene polymorphism. *Neurology*. 1997;49:614-7.

7. Sriklatkhachorn A, Anuntasethakul T, Maneesri S, Phansuwan-Pujito P, Palumraj S, Kasantikul V. Hyposerotonin-induced nitric oxide supersensitivity in the cerebral microcirculation. *Headache* 2000;40:267-75.

8. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Serotonin and histamine. In: Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. New York, NY: Oxford University Press; 1991:338-80.

9. Paxinos G, watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd edition. North Ryde: Academic Press; 1986.

10. Wang H, Nie H, Zhang RX, Qiao JT. Peripheral nitric oxide contributes to both formalin- and NMDA-induced activation of nociceptors: An immunocytochemical study in rats. *J Neurosci Res* 1999;57:824-9.

11. Gao WC, Qiao JT. Nitric oxide contributes to both spinal nociceptive transmission and its descending inhibition in rats: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 1998;240:143-6.

12. Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R. Expression of NADPH-diaphorase and colocalization with Fos in the brain neurons of the rat following visceral noxious stimulation. *Brain Res* 1999 Jul 10;834(1-2):173-7.

13. Christiansen I, Thomsen LL, Daugaard D, Ulrich V, Olesen J. Glyceryl trinitrate induces attacks of migraine without aura in sufferers of migraine with aura. *Cephalalgia* 1999;19:660-7.

14. Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res* 1995 Jun 5;682(1-2):167-81.

15. Tassorelli C, Joseph SA. NADPH-diaphorase activity and Fos expression in brain nuclei following nitroglycerin administration. *Brain Res* 1995 Oct 9;695(1):37-44.

16. Knyihar-Csillik E, Vecsei L. Effect of a nitric oxide donor on nitroxergic nerve fibers in the rat dura mater. *Neurosci Lett* 1999 Jan 29;260(2):97-100.

17. Fozard JR. The 5-hydroxytryptamine-nitric oxide connection: the key link in the initiation of migraine? *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995;329:111-9.

18. Stepien A, Chalimoniuk M, Strosznajder J. Serotonin 5-$HT_{1B/D}$ agonists abolish NMDA-evoked enhancement of nitric oxide synthase and cGMP concentration in brain cortex slices. *Cephalalgia* 1999;19:859-65.

19. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma proteins occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci* 1987;7:4129-36.

20. Goadsby PJ, Hoskin KL. Differential effects of low dose CP122,288 and eletriptan on Fos expression due to stimulation of the superior sagittal sinus in cat. *Pain* 1999;82:15-22.

21. Roon KI, Olsen J, Diener HC, Ellis P, Hettiarachchi J, Poole PH, Christianssen I, Kleinermans D, Kok JG, Ferrari MD. No acute antimigraine efficacy of CP-122,288, a highly potent inhibitor of neurogenic inflammation: results of two randomized double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Ann Neurol* 2000;47:238-41.

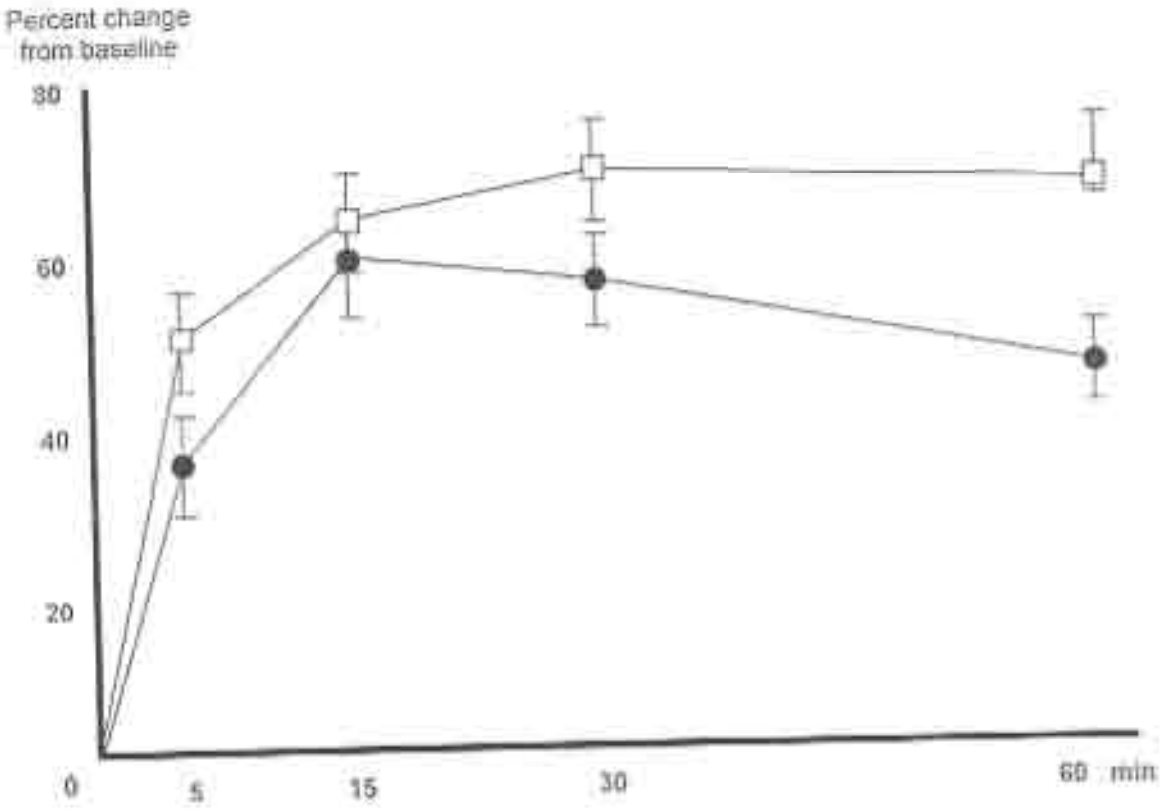
Table 1. Effect of PCPA on NITROGLYCERIN-induced pial arteriolar dilatation. Data are expressed as mean±SEM and 95% confidence interval of percent change from baseline diameters.

Time	Group	Mean (SEM)	95%CI	Difference PCPA-Control	P-value
Min 5	Control	36.4 (4.1)	28.2-44.7	14.7±5.9 (2.9 to 26.5)	.015
	PCPA	51.1 (4.3)	42.5-59.6		
Min 15	Control	59.3 (5.4)	48.4-70.2	4.6±7.0 (-9.4 to 18.6)	.519
	PCPA	63.9 (4.5)	54.7-73.1		
Min 30	Control	56.5 (5.9)	43.7-67.4	13.6±7.0 (-1.4 to 28.6)	.074
	PCPA	69.1 (4.7)	59.6-78.7		
Min 60	Control	45.5 (4.7)	35.9-55.1	22.9±6.7 (9.45 to 36.2)	.001
	PCPA	68.4 (4.7)	48.8-78.0		

Table 2. Effect of PCPA on the number of NO-evoked FosIR cells in brainstem nuclei. Data were expressed as median and range of sum of five sections for each nucleus. No significant difference was observed in any brainstem nucleus when the number of FosIR cells between PCPA-pretreatment and the control groups were compared.

Area	Group	Median	IQ Range	P-value
TNC	Control	140	134-160	.851
	PCPA	158	138-164	
Lateral reticular nucleus	Control	240	188-262	.678
	PCPA	204	168-266	
Nucleus tractus solitarius	Control	232	166-398	.724
	PCPA	186	154-374	
Inferior olive	Control	178	98-202	.092
	PCPA	154	120-158	

Figure 1. Effect of PCPA on nitroglycerin-induced pial arteriolar dilatation. Data are expressed as mean±SEM of percent change from baseline diameters.



Reprint of the Published Article:

Title:

Ultrastructural changes in endothelial cells of cerebral microvessels after exposure to nitric oxide donor

Neuropathology 1999;19:249-58.

Neuropathology 1999; 19, 259–266

Original Article

Ultrastructural changes in endothelial cells of cerebral microvessels after exposure to nitric oxide donor

Thiraporn Anuntasethakul,[1] Anan Srikiatkhachorn,[1] Supang Maneesri,[2] Suthilak Patumraj[1] and Vira Kasantikul[2]

Departments of [1]Physiology and [2]Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

It has been largely accepted that nitric oxide (NO) plays an important role in cerebral vasomotor control. NO has also been proposed to be a significant chemical in the process of endothelial cell injuries in various pathological conditions. Although the toxic effect of high concentrations of NO has been shown, only a few ultrastructural studies have been reported. The purpose of this study is to demonstrate physiological and pathological changes in cerebral microvessels after exposure to a high dose of NO donor. Glyceryl trinitrate, a NO donating chemical, was administered intravenously (10 mg/kg) to experimental rats. The vasomotor response was monitored by *In vivo* fluorescein videomicroscopy and ultrastructural changes were studied using transmission electron microscopy. The result showed long-lasting vasodilatation of pial microvessels. The greatest response was observed in microvessels with baseline diameter of less than 10 μm compared with microvessels of a larger diameter ($P = 0.003$). Exposure to NO donor produced considerable changes in the ultrastructure of cerebral microvessels. Such morphological changes were characterized by increased pinocytosis, increased microvillous formation, mitochondrial swelling, doming of the endothelial surface, swelling of the perivascular astrocytic foot plate and partial separation of endothelial cells from the adjacent brain tissue. These results confirm the cytotoxic effect of NO on cerebral endothelial cell and further elaborate the role of this substance in endothelial cell injury observed in various conditions.

Key words: cerebral vessel, endothelial cell, nitric oxide, ultrastructure.

Correspondence: Anan Srikiatkhachorn, MD, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Email: fmedask@md2.md.chula.ac.th

Received 6 January 1999; revised and accepted 15 February 1999.

INTRODUCTION

The control of cerebral circulation is a complex process and involves multiple mechanisms as well as a wide variety of chemical messengers. Recently, it has been largely accepted that nitric oxide (NO) plays a major role in the physiological control of cerebral vasodilatation. This molecule serves as a final common pathway of various vasodilating processes such as vasodilatation in response to neurotransmitters, hypercarbia etc.

Exposure to NO can result in different cellular effects based on its concentration. At the optimal level, NO possesses cytoprotective activity. A recent experiment demonstrated that administration of a NO donor could prevent endothelial cell injury due to ischemia and reperfusion in the rabbit hind limb.[1] On the other hand, high concentrations of NO have been demonstrated to play a role in the pathogenesis of some conditions. For example, a recent experiment using human pulmonary artery endothelial cells showed that a high level of NO released by activated monocytes contributes to endothelial injury.[2] Nitric oxide also inhibits endothelial cell mitogenesis and proliferation by inhibiting DNA synthesis and thus impairing regrowth of the endothelial cells in states of disease.[3] In most circumstances, high concentrations of NO result from the activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS), a calcium non-dependent isoform of NOS. Induction of iNOS has been shown to produce high levels of NO which leads to tissue-damaging free radical production.[4] Such free radicals include peroxynitrite ($ONOO^-$), NO_2 etc. The higher the increase of NO, the more toxic the oxidized metabolites. The toxic effect of NO is further confirmed by observations that administration of NOS inhibitors can prevent cell death in various ischemic models.

Although the toxic effect of high concentrations of NO has been shown, only few ultrastructural studies have been

reported. The present study was aimed at demonstrating the ultrastructural changes in cerebral microvessels after exposure to glyceryl trinitrate (GTN), a NO donating compound. The GTN-induced vasomotor response was monitored by *in vivo* fluorescein videomicroscopy and ultrastructural changes were studied using transmission electron microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Surgical preparation

Male Wistar Furth rats, weighing 300–350 g, were anesthetized for the duration of experiments by intraperitoneal administration of 50 mg/kg of sodium pentobarbital. Additional doses of anesthetics were given as required to maintain surgical anesthesia based on testing of corneal reflex and response to tail pinch. Tracheostomy was performed and ventilation was assisted by a positive pressure ventilator (Rodent ventilator model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). A femoral artery and a femoral vein were cannulated to record blood pressure and for intravenous infusion of drugs, respectively. Blood pressure was monitored throughout experiments with a pressure transducer (Nikhon model TP-300T; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) which was recorded on a polygraph (Nikhon RM 6000; Nihon Kohden). Arterial blood was collected periodically for determination of pH, PaO_2 and $PaCO_2$ by a pH/blood gas analyzer (238 pH/blood gas analyzer; Ciba Corning Diagnostics, Essex, UK).

Intravital fluorescein videomonitoring technique

After tracheostomy and cannulation had been performed, each of the rats was placed in a frame and the head securely positioned with a head holder. The skull was exposed and the frontal bone was thinned by drilling with a saline-cooled drill until the blood vessels of the dura were clearly visible. The superior sagittal sinus was exposed and the dura was then opened using a microneedle. A cranial window was placed over the craniotomy opening. An artificial cerebrospinal fluid was infused into the intracranial space. After cranial window was fitted, the animal was placed under the fluorescein microscope (Optiphot 2; Nikon, Tokyo, Japan) fitted with the videomonitoring system (SIT Camera; SIT-MTI, Michigan, IN, USA). Fluorescein-isothiocyanate-labeled dextran (150 000 MW; FITC-dx-150, Sigma, St Louis, MO, USA) was injected intravenously in order to visualize the pial microvessels.

In order to examine the effect of nitric oxide donor on pial microcirculation, glyceryl trinitrate (2 mg/kg per min) was infused intravenously in the experimental group for the period of 5 min (total dose = 10 mg/kg). A comparable volume of physiological saline was infused in the control group. The images of pial microvessels at 0, 5, 15, 30 and 60 min postinfusion were stored with the video system for further playback analysis. The videotape recorded from each experiment was played back frame by frame and vessels of different diameter were randomly selected. Vessels were divided into three groups based on their baseline diameter: vessels with a diameter of less than 10 μm; between 10 and 30 μm; and greater than 30 μm. Images of selected vessels were digitized and the diameters of those vessels were determined using the computer program 'Global Lab Image' (Data Translation, MA, USA).

Ultrastructural study

Two hours after drug infusion, the rats were killed with an excessive dose of sodium pentobarbital. The animals were perfused transcardially with 250 mL phosphate-buffered saline, followed with 250 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate-buffered saline. After perfusion, the cranial window was removed and a small portion of the anterior parietal cortex was cut into multiple 1 × 1 mm cubes. The brain specimens were immediately immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4) for at least 4 h and postfixed with 1% osmium tetroxide for at least 1 h. Tissues were dehydrated through a graded series of ethanol, passed through two changes of propylene oxide and, finally, embedded in a plastic block (Epon 812). Semithin and ultrathin sections were cut with ultramicrotome using diamond knives. The semithin sections were stained with toluidine blue in order to select suitable tissue for electron microscopy. The ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined under the transmission electron microscope (JEM 1210, JEOL, Tokyo, Japan).

Criteria of morphometric study

Morphological changes in the ultrastructure of endothelial cells of the cerebral microvessels were quantified. In order to define possible differences between ultrastructural changes in capillaries and arterioles, the studied pial microvessels were divided into two groups based on their diameter. Capillaries were defined as such if their diameters were equal or less than 10 μm. Vessels with a diameter greater than 10 μm were defined as arterioles. The morphometric parameters studied included the number of microvilli, number of intracytoplasmic pinocytic vesicles and mitochondrial diameter.

In order to determine the number of microvilli, 50 arterioles and 100 capillaries were randomly selected from five experimental animals. The numbers of microvilli in each vessel were counted and expressed as number of

by an increase in pinocytic vesicles, microvillous formation, mitochondrial swelling, doming of the endothelial surface, swelling of perivascular astrocytic foot plate and separation of endothelial cells from the adjacent brain tissue.

Microvillous formation

A significant increase in the number of endothelial microvilli was evident in the GTN-treated group compared with the control group (Fig. 2a). The average number of microvilli in vessels with a diameter of less than 10 μm was 0.5 ± 0.33 and 5.66 ± 3.32 microvilli per vessel for the control and GTN-treated groups, respectively ($P = 0.006$).

Table 1 Effect of glyceryl trinitrate on pial microcirculation

Group	% Change in pial microvessel diameter (% of baseline)			
	Capillary (< 10 μm)	Arteriole (10–30 μm)	Arteriole (30–60 μm)	*P* value
5 minute	68.1 ± 40.5 39.1–97.1	32.4 ± 20.1 12.3–52.5	22.7 ± 18.2 9.7–35.7	0.006
15 minute	106.3 ± 36.1 80.4–132.1	53.6 ± 34.4 31.2–76.9	33.9 ± 19.2 20.2–47.6	< 0.001
30 minute	106.2 ± 46.5 72.9–139.5	40.4 ± 25.9 21.9–59.0	36.7 ± 23.3 20.1–53.4	< 0.001
60 minute	109.1 ± 40.6 80.1–138.1	42.6 ± 25.9 24.1–61.2	33.3 ± 20.7 18.5–48.1	< 0.001

Marked vasodilatation was observed after glyceryl trinitrate (GTN) infusion and persisted for 30–60 min. Pial capillaries (diameter less than 10 μm) were significantly more sensitive to GTN infusion as compared with the others ($P < 0.001$, ANOVA) at all periods of measurement. Values were expressed as mean ± SD and 95% confidence interval of percentage change from baseline diameter.

The same pattern of increase was observed in vessels with a diameter greater than 10 μm. The average number of microvilli in these vessels was 1.28 ± 0.86 and 9.16 ± 3.54 for the control and GTN-treated groups, respectively ($P = 0.025$).

Number of pinocytic vesicles

Only a low number of pinocytic vesicles was observed in endothelial cells of the cerebral microvessels in the control group. These vesicles became more abundant in endothelial cells of cerebral microvessels taken from GTN-treated rats. Increased pinocytosis was demonstrated on both the luminal and abluminal surfaces of cerebral microvessels (Fig. 3a). The average density of pinocytic vesicles in cerebral capillaries was 9.92 ± 2.75 and 27.28 ± 2.76 vesicles/μm^2 for the control and experimental groups, respectively ($P < 0.001$). In arterioles, the density of pinocytic vesicles was 9.68 ± 1.36 and 27.84 ± 3.49 vesicles/μm^2 for the control and GTN-treated rats, respectively ($P < 0.001$).

Mitochondrial diameter

The average mitochondrial diameter in cerebral microvessels with a diameter less and greater than 10 μm taken from the control group was 167.42 ± 38.67 and 154.76 ± 39.95, respectively. A significant increase in mitochondrial diameter was evident in the GTN-treated group ($P = 0.008$) (Fig. 3b). The average mitochondrial diameter in the GTN-treated rats was 210.61 ± 8.55 and 221.59 ± 25.75 for

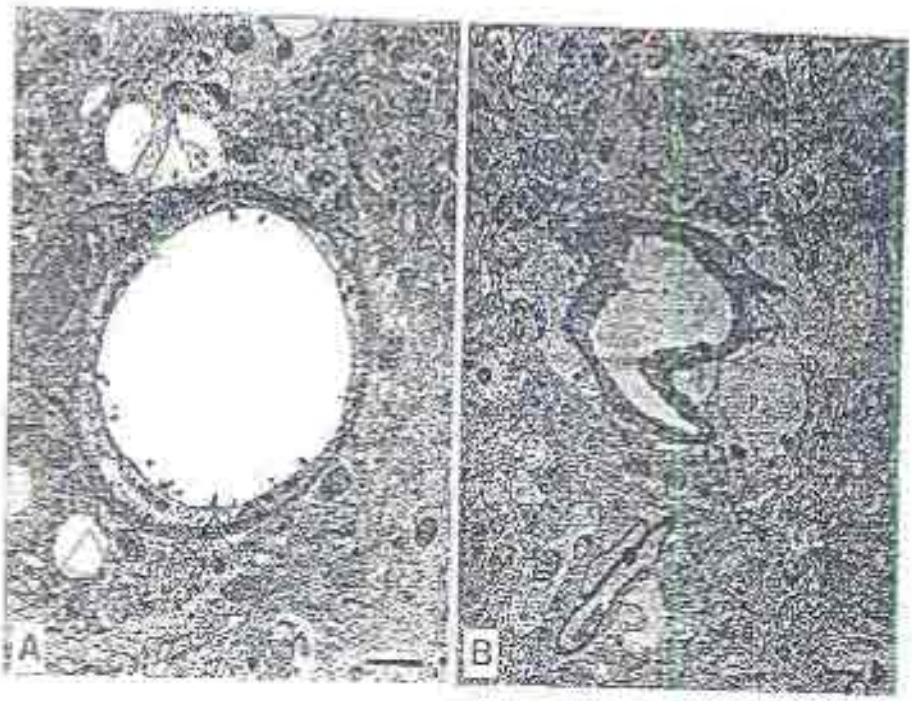


Fig. 2 Electron micrograph of cerebral microvessels from glyceryltrinitrate-treated rats showing (**a**) an increase in microvillous formation (×10 200) and (**b**) partial separation of a cerebral microvessel from adjacent brain tissue (×6800). Bar = 1 μm.

potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244–4250.

14. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481–487.
15. Kaushalya S, Nath J. Interactive role of nitric oxide and superoxide anion in neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 185–191.
16. Degnim AC, Morrow SE, Ku J, Nakayama DK. Nitric oxide inhibits peroxidase-mediated endothelial cell toxicity. *J Surg Res* 1998; 75: 127–134.
17. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J-L, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; 9: 1277–1287.
18. Shen YH, Wang XL, Wilcken DE. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett* 1997; 433: 125–131.

Reprint of the Published Article:

Title:

Hyposerotonin-induced nitric oxide supersensitivity in the cerebral microcirculation

Headache 2000;40:267-75

Editorial Board
Editor
Keith Campbell, MD
Rochester, Minnesota

Abstracts Editor
Kenneth L. Moore, MD
Oak Park, Illinois

Members
Frank Andreasik, PhD
Pensacola, Florida

Joel R. Dalkin, MD
Boston, Massachusetts

James J. Corbett, MD
Jackson, Mississippi

Donald J. Delisalo, MD
La Jolla, California

Sylvan Fernandez, PhD
Dallas, Texas

Alan E. Lake, III, PhD
Ann Arbor, Michigan

Richard B. Lipton, MD
Bronx, New York

Gian C. Manzoni, MD
Parma, Italy

Paolo Martelletti, MD
Rome, Italy

Noah T. Mathew, MD
Houston, Texas

Michael A. Moskowitz, MD
Boston, Massachusetts

Neil Raskin, MD
San Francisco, California

Stephen D. Silberstein, MD
Philadelphia, Pennsylvania

William K. Solberg, DDS
Los Angeles, California

Book Review Editor
Jerry W. Swanson, MD
Rochester, Minnesota

Expert Opinion
Section Editor
Randolph W. Evans, MD
Houston, Texas

Assistant to the Editor
Gloria Stumpff
Rochester, Minnesota
Telephone: 507-282-8899
Facsimile: 507-282-4796

Copyright © 2000
by the
American Headache
Society

HEADACHE

The Journal of Head and Face Pain

Official Publication of the American Headache Society
(formerly the American Association for the Study of Headache)

Volume 40, Number 4 April 2000

Contents of April Issue

Original Articles

Page

Hypocretonin-Induced Nitric Oxide Supersensitivity in the Cerebral Microcirculation 267
Anan Srikiatkhachorn, MD; Thiraporn Anuntaseksakul, PhD; Supong Maneesri, MSc; Pannisi Phanthumchinnapat, PhD; Suthilak Patumraj, PhD; Vira Kaoustikul, MD

Cluster Headache Is Not Associated With Signs of a Systemic Inflammation 276
Ingela Nilsson Remahl, MD, PhD; Elisabet Waldenlind, MD, PhD; Johan Ekman, MD, PhD; Karl Ekbom, MD, PhD

The Migraine ACE Model: Evaluating the Impact on Time Lost and Medical Resource Use 282
J. Jaime Caro, MDCM; Graciela Caro, MA; Denis Gerstein, BA; Gabriel Raggio, PhD; Michael Burrows, BA; Libby Black, PharmD

Magnetic Resonance Imaging of Intracranial Hypotension Syndrome With Pathophysiological Correlation 292
T.C. Brightbill, MD; R. Scott Goodwin, MD; Robert G. Ford, MD

Treatment of Tension-type Headache With Botulinum Toxin Type A: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study 300
Jens D. Rollnik, MD; Oliver Tonneberger; Margot Schubert, MD; Udo Schneider, MD; Reinhard Dengler, MD

Chronic Daily Headache: A Time Perspective 306
Egilius L.H. Spierings, MD, PhD; Annick H. Ranke, BSc; Maya Schroevers, MSc; Peter C. Hunkoop, MSc

Use of Percutaneous Electrical Nerve Stimulation (PENS) in the Short-term Management of Headaches 311
Hesham E. Ahmed, MD; Paul F. White, PhD, MD, FANZCA; William F. Craig, MD; Mohamed A. Hamza, MD; El-sayed A. Ghoneim, MD; Noor M. Gajraj, MD

Sumatriptan in Patients With Postdural Puncture Headache 316
Neil Roy Connolly, MD; Robert K. Packer, DO; Armin Rahimi, DO; Charles S. Gibson, RN

Case Reports

Limb-Threatening Ischemia Due to Ergotamine: Case Report With Angiographic Evidence 320
Rolf Salvesen, MD, PhD; Jan Fredrik Pryn, MD

Transient Global Amnesia, Migraine, Thalamic Infarct, Dihydroergotamine, and Sumatriptan 324
A. Pradalier, MD; G. Lam, MD; D. Vincent, MD

Regular Departments

Letter to the Editor 329

Abstracts and Citations 329

Instructions for Authors 366

Proposed Change to AHS Constitution 364

Hyposerotonin-Induced Nitric Oxide Supersensitivity in the Cerebral Microcirculation

Anan Srikiatkhachorn, MD; Thiraporn Anuntasethakul, PhD; Supang Maneesri, MSc; Pansiri Phansuwan-Pujito, PhD; Suthilak Paramraj, PhD; Vira Kasantikul, MD

Objective.–To investigate the relationship between hyposerotonin and cranial microvascular responses to nitric oxide (NO).

Background.–Although the mechanism underlying NO supersensitivity in migraine is still unclear, an alteration of the serotonin system is a possible explanation.

Methods.–Wistar rats were divided into control and hyposerotonin groups. Serotonin was depleted by intraperitoneal injection with 300 mg/kg of para-chlorophenylalanine (PCPA), a tryptophan hydroxylase inhibitor. Three days after PCPA pretreatment, the animals were prepared for assessment of their NO-induced vasomotor response using glyceryl trinitrate (GTN: 8 to 10 mg/kg, intravenously) as an NO donor. Pial circulation was visualized by the intravital fluorescein videomicroscopic technique. Images of vessels at 0, 5, 15, 30, and 60 minutes post GTN infusion were digitized and measured. At the end of monitoring, the rat brains were removed for ultrastructural study of the brain microvessels.

Results.–Infusion of GTN produced dose-dependent pial arteriolar dilatation. This vasodilator effect was significantly increased in the PCPA-treated groups, especially at 30 and 60 minutes. The percentage change from baseline diameter at 30 minutes after the 8-mg/kg GTN infusion was 42.6 ± 3.1 for the hyposerotonin group and 16.8 ± 2.9 for the control group ($P<.001$). Electron microscopic study revealed that exposure to the NO donor produced considerable changes in cerebral microvessels, characterized by focal ballooning of endothelial cells, increased microvillous formation, and increased endothelial pinocytosis. These anatomical changes were significantly more prominent in the hyposerotonin group.

Conclusions.–A hyposerotoninergic condition can facilitate the NO-induced physiological and pathological responses in meningeal and cerebral microvessels and, therefore, is a possible explanation for the supersensitivity to NO observed in patients with migraine.

Key words: migraine, serotonin, nitric oxide, cerebral microcirculation, endothelial cells

Abbreviations: NO nitric oxide, cGMP cyclic guanosine monophosphate, 5-HT serotonin, PCPA para-chlorophenylalanine, GTN glyceryl trinitrate

(*Headache* 2000;40:267-275)

From the Departments of Physiology (Drs. Srikiatkhachorn, Anuntasethakul, and Paramraj) and Pathology (Ms. Maneesri and Dr. Kasantikul), Faculty of Medicine, Chulalongkorn University; and the Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University (Dr. Phansuwan-Pujito), Bangkok, Thailand.

Address all correspondence to Dr. Anan Srikiatkhachorn, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Accepted for publication October 21, 1999.

Nitric oxide (NO) is a major neurotransmitter that plays a significant role in the control of cerebral circulation. This chemical serves as a final common pathway for various vasodilating processes. Besides its role in vasomotor control, NO also has an important function in pain-processing mechanisms. Increased activity of nitric oxidergic transmission in the spinal dorsal horn has been proposed as a crucial step in the development of central sensitization, which leads to a hyperalgesic state.

Supersensitivity of cerebral vessels to NO has been recently proposed to be a possible mechanism of migraine pathogenesis.[1] Clinically, the administration of an NO-donating compound resulted in stronger headache in patients with migraine compared with patients with tension-type headache or nonheadache controls. Its involvement has been further confirmed by observations of increased platelet NO and its active intermediate, cyclic guanosine monophosphate (cGMP), in patients with migraine compared with nonheadache controls, especially during migrainous attacks.[2,3] Nitric oxide synthase inhibitor has been introduced into migraine pharmacotherapy.[4] Though various pieces of evidence suggest an involvement of NO in migraine pathogenesis, the mechanism underlying such NO supersensitivity has not yet been brought to light.

It has long been known that serotonin (5-HT) plays an important role in migraine pathogenesis. In 1989, Ferrari et al demonstrated that attacks of migraine coincided with a fall in platelet 5-HT as well as an increase in plasma 5-HT.[5] The administration of 5-HT or 5-HT agonists (mainly $5\text{-HT}_{1B/D}$ agonists) can abort the attack of migraine. These findings imply a relationship between 5-HT depletion and the development of a migraine attack. Therefore, it is possible that 5-HT depletion may sensitize cranial vessels, resulting in supersensitivity to NO. In the following study, we employ an experimental model to investigate the effect of hyposerotonin on meningeal and cerebral microcirculatory responses to NO.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Design.–Male Wistar Furth rats weighing 300 to 350 g were divided into two groups, with and without 5-HT depletion. In the 5-HT-depleted group, 300 mg/kg of para-chlorophenylalanine (PCPA), a tryptophan hydroxylase inhibitor, was administered intraperitoneally prior to the experiment. This regimen can deplete 5-HT in the brain to less than 20% of the normal amount.[6] Physiological saline of the same volume was given to the control group. Three days after PCPA pretreatment, the animals were prepared for the assessment of NO-induced intracranial microvascular response using glyceryl trinitrate (GTN) as an NO-donating agent. The response of the meningeal microcirculation to the NO donor was monitored in vivo by the fluorescein videomicroscopic technique. Changes in the ultrastructure of cerebral endothelial cells were studied by electron microscopy.

Surgical Preparation and Intravital Fluorescein Videomonitoring Technique.–The rats were anesthetized for the duration of the experiments by the intraperitoneal administration of 50 mg/kg of sodium pentobarbital. Additional doses of anesthetics were given as required to maintain surgical anesthesia based on testing of the corneal reflex and response to tail pinch. Tracheostomy was performed and ventilation was assisted by a positive pressure ventilator (Rodent ventilator model 683; Harvard Apparatus, South Natick, Mass). A femoral artery and a femoral vein were cannulated to record blood pressure and for the intravenous infusion of drugs, respectively. Blood pressure was monitored throughout the experiments with a pressure transducer (Nikhon model TP-300T; Nihon Khoden, Tokyo, Japan) and recorded on a polygraph (Nikhon RM 6000). Arterial blood was collected periodically for the determination of pH, PaO_2, and $PaCO_2$ by a pH/blood gas analyzer (238 pH/blood gas analyzer; Ciba Corning Diagnostics, Essex, UK).

After tracheostomy and cannulation had been performed, the rats were placed on a surgical frame and the head was securely positioned with a head holder. The skull was exposed, and the frontal bone was thinned by drilling with a saline-cooled drill until the blood vessels of the dura became clearly visible. The superior sagittal sinus was exposed, and the dura was then opened using a microneedle. A cranial window was placed over the craniotomy opening. An artificial cerebrospinal fluid was infused into the intracranial space. After cranial window placement, the animal was placed under the fluorescein microscope (Optiphot 2; Nikon, Tokyo, Japan) fitted with the videomonitoring system (SIT Camera; SIT-MTI, Michigan, Ind). Fluorescein-isothiocyanate-labeled dextran (FITC-Dx-150), molecular weight 150000, was injected intravenously to visualize the pial microvessels. Glyceryl trinitrate (2 mg/kg per minute) was infused intravenously until the total dose of 8 or 10 mg/kg was reached. The images of pial microvessels at 0, 5, 15, 30, and 60 minutes post infusion were stored within the videosystem for further playback analysis.

The videotape recorded from each experiment was played back frame by frame, and the pial vessels were randomly selected. Vessels with a baseline diameter between 10 and 30 μm were selected for measurement, since these small arterioles are regarded as resistance vessels and play a significant role in the control of regional blood flow. Twenty vessels were randomly selected from each group of five rats. The images of selected vessels were digitized, and the diameters of those vessels were determined by using the computer program Global Lab Image.

Ultrastructural Study.–Two hours after drug infusion, the rats were humanely killed with an excessive dose of sodium pentobarbital. The animals were perfused transcardially with 250 mL of phosphate buffer saline, followed by 250 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 mol phosphate buffer saline. After perfusion, the cranial window was removed, and a small portion of the anterior parietal cortex was cut into multiple cubes, 1 × 1 mm. The brain specimens were immediately immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol phosphate buffer saline (pH 7.4) for at least 4 hours and were postfixed with 1% osmium tetroxide for at least 1 hour. The tissues were dehydrated through a graded series of ethanol, were passed through two changes of propylene oxide, and were finally embedded in plastic block (Epon 812; Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, Pa). Semithin and ultrathin sections were cut with ultramicrotome using glass knives. The semithin sections were stained with toluidine blue in order to select suitable tissue for electron microscopy. The ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined under the transmission electron microscope (JEOL, JEM 1210; JEOL, Tokyo, Japan).

Criteria of Morphometric Study.–Morphological changes in the ultrastructure of endothelial cells of cerebral microvessels were quantified. The morphometric parameters studied included the number of microvilli, the number of intracytoplasmic pinocytic vesicles, and mitochondrial diameter. To determine the number of microvilli, 50 arterioles were randomly selected from each group of five rats. The numbers of microvilli in each vessel were counted and expressed as number of microvilli per vessel. The densities of pinocytic vesicles were quantified by counting their numbers in five randomly selected micrographs taken from each vessel. These numbers were averaged and expressed as number per square micrometer. The diameters of mitochondria of cerebral endothelial cells were measured at × 51,000 magnification. Mitochondria with diameters greater than the mean + 2 SD of the normal length were defined as swollen and were counted. Other changes in the ultrastructure of endothelial cells were also observed.

Statistical Analysis.–The effects on the pial vessel diameter produced by GTN were calculated as the maximum percentage change from predose baseline. All values were presented as mean ± standard error of mean (SEM) and 95% confidence interval (95% CI). To compare serial changes in vessel diameter, analysis of variance (ANOVA) for repeated measurement with the post hoc Bonferroni test was employed (SPSS version 7.5 for Windows). Statistical differences among various studied groups were compared using ANOVA or chi-square tests for interval and categorical data, respectively. Probability values of less than .05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Besides a slight decrease in motor activity, no significant change concerning body weight or vital signs was observed in the rats pretreated with PCPA. Infusion of GTN produced a transient decrease in systemic blood pressure. The mean arterial pressure at minute 0, 5, 15, 30, and 60 post infusion in animals receiving 10 mg/kg of GTN was 108.3 ± 10.4, 96.0 ± 4.9, 101.7 ± 4.7, 103.3 ± 4.7, and 103.3 ± 4.7 mm Hg, respectively. Mean arterial pressure difference between minute 0 and minute 5 was 12.3 ± 7.2 mm Hg (95% CI, 3.4-21.3; $P = .019$). Blood pressure rapidly became normal after GTN was removed. No change in arterial pH, PaO_2, and $PaCO_2$ was evident after GTN infusion. Pretreatment with PCPA did not produce any significant difference in GTN-induced change in systemic arterial pressure compared with those observed in the GTN-infusion group alone.

Effects of GTN on Pial Arterioles.–Pial arteriolar dilatation was observed almost immediately after GTN infusion, reached its peak at 15 minutes, and persisted for at least 60 minutes. The greatest differ-

Table 1.–Effect of PCPA on GTN-Induced Pial Arteriolar Dilatation

	GTN 8 mg/kg			GTN 10 mg/kg		
Time	PCPA −	PCPA +	P	PCPA −	PCPA +	P
Minute 5	23.22 ± 2.33 18.38-28.06	20.80 ± 2.31 16.39-25.22	1.000	32.40 ± 6.12 19.58-45.22	35.28 ± 2.58 29.89-40.67	1.000
Minute 15	22.36 ± 2.33 17.49-27.23	29.42 ± 1.51 26.26-32.58	1.000	55.57 ± 7.42 40.04-71.10	52.05 ± 5.12 41.33-62.78	1.000
Minute 30	16.77 ± 2.89 10.72-22.83	42.55 ± 3.10 36.06-49.05	< .001	40.43 ± 5.64 28.63-52.23	58.51 ± 4.91 48.23-68.79	0.024
Minute 60	12.74 ± 1.30 9.17-16.30	42.64 ± 4.45 33.33-51.94	< .001	42.61 ± 5.83 30.83-54.39	60.28 ± 4.75 50.33-70.23	0.034

Data are expressed as mean ± SEM and 95% confidence intervals of percentage change from baseline diameters. A significant increase in GTN-induced arteriolar dilatation was observed in the PCPA-pretreated group (PCPA +) compared with the control group (PCPA −), especially at minutes 30 and 60. Greater change was apparent in animals receiving a lower dose of GTN.

ence was at 15 minutes post infusion. The magnitude of the difference at 15 minutes in rats receiving 10 mg/kg of GTN was 55.57 ± 7.42% (95% CI, 40.04-71.10; $P<.001$). After 30 minutes, the degree of vasodilatation began to decline. A higher dose of GTN produced a greater degree of arteriolar dilatation. At minutes 15, 30, and 60 post infusion, the percentage dilatation of pial arterioles was statistically greater in the rats receiving 10 mg/kg of GTN, compared with those receiving 8 mg/kg ($P<.001$, ANOVA for repeated measurement with the post hoc Bonferroni test).

Pretreatment with PCPA did not affect the basal diameters of pial arterioles but enhanced the vasodilating effect of GTN. An increase in both the magnitude and duration of GTN-induced pial arteriolar dilatation was observed especially in the late phase (minutes 30 and 60). Percentage changes of pial arteriolar diameter at minute 30 in rats receiving 10 mg/kg of GTN were 58.51 ± 4.91% and 40.43 ± 5.64% for rats with and without PCPA pretreatment, respectively (magnitude of difference = 18.08 ± 6.05%; 95% CI, 1.61-34.55; $P=.024$). The effect of PCPA upon GTN-induced pial arteriolar dilatation was more prominent in rats receiving a lower dosage of GTN. At minute 30, the percentage changes in diameter in rats receiving 8 mg/kg of GTN were 42.55 ± 3.10% and 16.77 ± 2.89% for rats with and without PCPA pretreatment, respectively (magnitude of difference = 25.78 ± 6.08; 95% CI, 9.31-42.25; $P<.001$). The same trend was observed at minute 60. Details of the effects of PCPCA pretreatment on pial arteriolar response are shown in Table 1.

Ultrastructural Changes in Endothelial Cells of Cerebral Arterioles.–Changes in the ultrastructure of endothelial cells were evident in the GTN-infused group. The higher the dose of GTN, the more changes were observed. Such structural changes were characterized by an increase in pinocytic vesicles, microvillous formation, mitochondrial swelling, focal swelling of the endothelial surface, and periarteriolar astrocytic footplate swelling. Details of the morphometric study are shown in Table 2.

Number of Pinocytic Vesicles.–The most obvious change observed in GTN-infused groups was an increase in the density of pinocytic vesicles. In the control group, only a small number of pinocytic vesicles were observed in endothelial cells of the cerebral microvessels. Pretreatment with PCPA did not cause any significant change in the pinocytic vesicular density. On the contrary, these vesicles became more abundant in the endothelial cells of cerebral microvessels taken from rats receiving 10 mg/kg of GTN. Increased pinocytosis was demonstrated on both the luminal and abluminal surfaces of cerebral microvessels (Figure 1). The average density of pinocytic vesicles in cerebral arterioles was 9.68 ± 0.70,

Table 2.–Effect of Exposure to GTN on Ultrastructure of Cerebral Microvessels

	Microvilli (Villi per Cell)		Pinocytic Vesicle (Vesicle/μm²)	
	Mean ± SEM 95% CI	*P*	Mean ± SEM 95% CI	*P*
GTN0*-PCPA−	1.3 ± 0.4 0.2-2.3	1.000	9.66 ± 0.70 7.74-11.62	1.000
GTN0-PCPA+	2.3 ± 0.3 1.5-3.0		7.90 ± 0.56 6.34-9.46	
GTN8-PCPA−	3.4 ± 0.8 1.2-5.6	.045	9.86 ± 1.14 6.69-13.03	<.001
GTN8-PCPA+	9.5 ± 1.8 4.6-14.4		26.48 ± 1.76 21.61-31.35	
GTN10-PCPA−	9.2 ± 1.6 4.8-13.6	1.000	28.84 ± 1.56 24.51-33.17	1.000
GTN10-PCPA+	10.9 ± 2.0 5.3-16.4		25.12 ± 2.30 17.94-32.30	

In control animals (PCPA−), only a high dose of GTN (10 mg/kg) induced ultrastructural changes in cerebral arterioles, characterized by increased microvillus formation and increased pinocytosis. Pretreatment with PCPA can increase the sensitivity of endothelial cells to NO inducing morphological changes, especially in the animals receiving the lower dose of GTN.
*GTN0 indicates no GTN infusion; GTN8, 8 mg/kg GTN infusion; GTN10, 10 mg/kg GTN infusion; PCPA+, with PCPA pretreatment; and PCPA−, without PCPA pretreatment.

9.86 ± 1.14, and 28.84 ± 1.56 vesicle/μm², for the control, 8, and 10 mg/kg of GTN, respectively. No significant change was evident when the density of pinocytic vesicles from the group receiving 8 mg/kg of GTN and the controls were compared. Pretreatment with PCPA increased the sensitivity of this ultrastructural change as shown by a marked increase in the number of vesicles (26.48 ± 1.76 vesicle/μm²) in rats receiving PCPA pretreatment and 8 mg/kg GTN infusion. The average difference between the value observed in rats receiving 8 mg/kg GTN infusion with and without PCPA pretreatment was 16.62 ± 2.83 vesicle/μm² (95% CI, 9.51-23.73; $P<.001$). The increase in pinocytic vesicle density indicates an increase in transendothelial transport and possibly reflects an abnormality in blood-brain barrier function.

Microvillous Formation.–Our results showed that the average number of microvilli in cerebral microvessels in rats without PCPA pretreatment was 1.3 ± 0.4, 3.4 ± 0.8, and 9.2 ± 1.6 microvilli per vessel for the control, 8, and 10 mg/kg GTN-treated groups, respectively. A greater density of microvilli observed in the 10 mg/kg GTN-treated group was statistically significant ($P=.005$), as compared with the controls. Pretreatment with PCPA resulted in a greater density of microvilli especially in the groups receiving 8 mg/kg of GTN. The average difference between the microvilli number observed in rats receiving 8 mg/kg GTN infusion with and without PCPA pretreatment was 6.12 ± 1.87 microvilli per vessel (95% CI, 0.04-12.20; $P=.048$) (Figure 2).

Mitochondrial Diameter.–The average mitochondrial diameter in cerebral microvessels taken from the control group was 154.76 ± 39.95 nm. Therefore, the mitochondria with diameter greater than 235 nm (mean + 2 SD) were defined as swollen. The percentage of swollen mitochondria was significantly greater in GTN-treated groups as compared with the controls (3.15%, 15.68%, and 23.53% for control, 8, and 10 mg/kg GTN-treated groups, respectively, $P<.001$). A greater percentage of swollen mitochondria was shown in the 8 mg/kg GTN-treated rats with PCPA pretreatment as compared with those receiving the same dose of GTN but without PCPA pretreatment (35.16% and 15.68%, respectively, $P=.002$). No significant difference was observed when the values taken from the 10 mg/kg GTN-treated groups with and without PCPA pretreatment were compared (28.42% and 23.53%, respectively, $P=.456$).

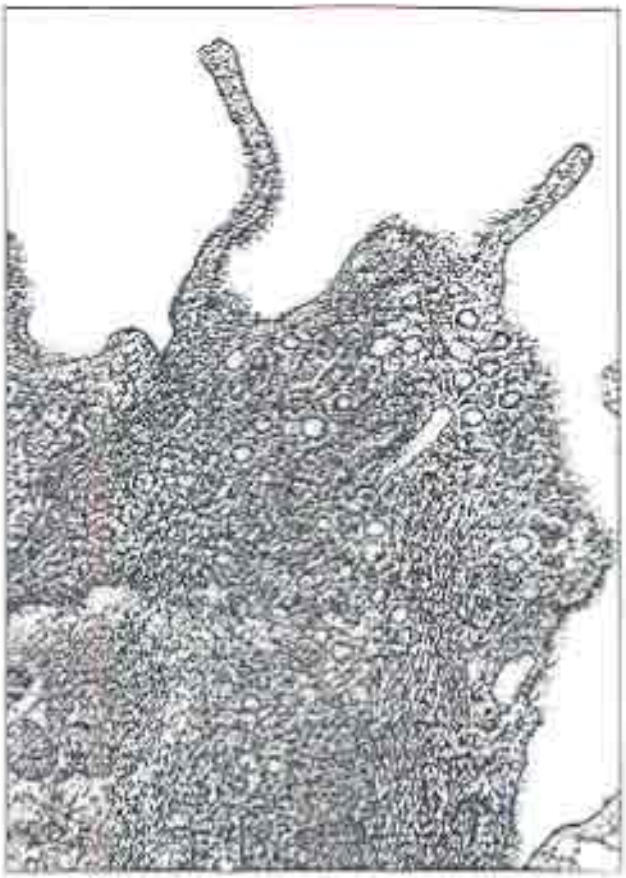


Fig 1.–Electron micrograph showing increased pinocytic vesicles and microvillous formations in cerebral arterioles after infusion of GTN. These changes can be facilitated by pretreatment with PCPA. (× 51000)

Other Morphological Changes.–Other abnormal features observed in the GTN-treated groups included edema of the periarteriolar astrocytic footplate and dome-like protrusion of endothelial cells into the luminal surface. Both features were not seen in the control group. The number of arterioles with periarteriolar astrocytic footplate swelling observed in 50 vessels in the control and the 10 mg/kg GTN-treated groups was 2 and 29 vessels respectively (odds ratio [OR] = 22.15; 95% CI, 4.50-47.64; $P<.001$). No significant change was observed when the values for animals with and without PCPA pretreatment were compared.

COMMENTS

In the present study, we demonstrated an enhancing effect of PCPA on GTN-induced pial arteriolar response. The physiological observations coincided with considerable changes in the ultrastructure of endothelial cells in cerebral microvessels. Such structural changes were characterized by increased pinocytic vesicles, increased microvillous formation, swelling of endothelial mitochondria, focal swelling of endothelial cells, and swelling of the periarteriolar astrocytic footplate. Since PCPA is a strong 5-HT depleting agent, the observed physiological and pathological findings reported here imply that the cerebrovascular responses to NO can be facilitated in the hyposerotoninergic condition.

It has been widely accepted that NO plays an important role in the control of cerebral circulation. This molecule acts by coupling with the heme group in the molecule of cytoplasmic guanylate cyclase, the enzyme catalyzing cGMP formation. In vascular smooth-muscle cells, the rise in cytoplasmic cGMP results in the relaxation of smooth-muscle fiber, which leads to vasodilatation. Immunohistochemical study showed that nitric oxide synthase is present in the dura mater, the site where vascular headache develops.[7]

It has been suggested that nitric oxide plays a key role in migraine. This hypothesis was deduced from the observation that infusion of GTN produced stronger headache in patients with migraine compared with nonheadache controls and patients with tension-type headache.[8] In addition, after the administration of nitrate-containing compound, patients with mi-

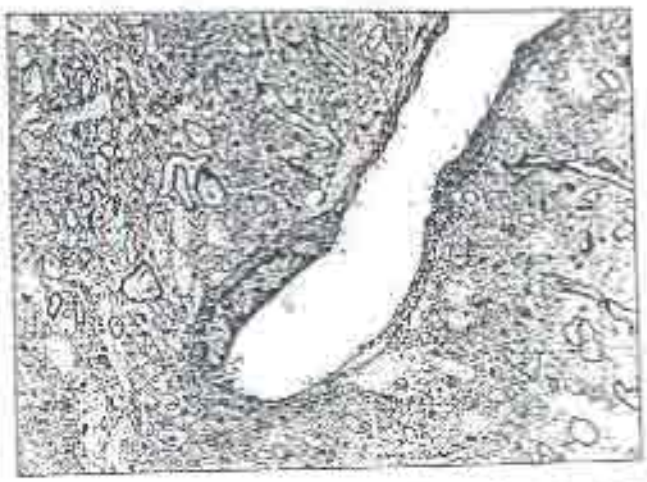


Fig 2.–Electron micrograph showing numerous microvillous formations in cerebral arterioles after exposure to the NO donor. (× 5100)

graine developed typical migraine attacks, which were accompanied by a prolonged arterial vasodilatation compared with nonheadache controls.[8] Interestingly, in this experiment, prolonged NO-induced vasodilatation was also observed in animals receiving PCPA pretreatment. The involvement of NO in migraine is further confirmed by the observation that GTN infusion enhanced NO release during cortical spreading depression, a physiological phenomenon underlying migraine aura.[10] Besides the induction of dilatation in large intracranial arteries, NO may be involved in the development of vascular headache by initiating a perivascular neurogenic inflammation with liberation of vasoactive peptides. This proposed mechanism may explain the delayed NO-induced headache observed in patients with migraine. Another possible mechanism involves the effect of NO in the modulation of pain threshold. Thomsen et al demonstrated that the administration of GTN induced a decrease in both detection and tolerance thresholds in the temporal region, as measured by pressure algesimetry.[11]

Although several lines of investigation suggest that patients with migraine are supersensitive to NO, the mechanism underlying this supersensitivity is still unclear. Recent experiments aimed at detecting a genetic polymorphism for endothelial nitric oxide synthase showed neither association of the nitric oxide synthase microsatellite nor linkage to migraine and, therefore, did not support a role for this gene in migraine etiology.[12] This finding implies that supersensitivity to NO observed in patients with migraine is likely to be due to indirect mechanisms rather than to direct hyperfunction of the NO-cGMP system. An observation that NO metabolisms in patients with menstrual migraine could vary depending on the phase of the menstrual cycle also suggests the effects of extraneous factors on NO sensitivity.[13]

In the search for the possible cause of NO supersensitivity observed in patients with migraine, we developed an animal model to investigate the role of 5-HT depletion on NO response in intracranial microvessels. It is now accepted that 5-HT plays a pivotal role in migraine pathogenesis. A significant decrease in platelet 5-HT content has been demonstrated during a migraine attack.[3] Moreover, the administration of reserpine, which caused a fall in plasma 5-HT, may trigger typical migraine attacks in patients with migraine.[14] These pieces of evidence raise the possibility that hyposerotonin is a crucial step in the initiation of migraine attacks. Our findings of an enhanced microvascular response to NO in 5-HT-depleted animals supported this hypothesis and also imply the role of hyposerotonin in the modulation of a cranial vascular response to NO. It is well recognized that the 5-$HT_{1B/1D}$ receptor is the predominant 5-HT receptor subtype in cranial vessels. This receptor can counterbalance the vasodilating effect of NO by decreasing cAMP turnover in vascular smooth-muscle cells, resulting in vasoconstriction. However, whether this effect is specific to NO-dependent vasodilatation is still open to question. Further studies are certainly needed to shed more light on this problem. On the neuronal level, 5-HT can also counteract NO-related nociceptive facilitation at dorsal horn neurons mainly by presynaptic inhibition via the 5-HT_{1D} receptor.

In this study, various morphological changes have been observed in cerebral microvessels after exposure to the NO donor. Although the infusion of GTN caused a transient decrease in systemic blood pressure, the difference was only 10% so it was unlikely to cause any morphological changes. Other physiological parameters including arterial pH and arterial blood gas were kept stable throughout the experiment. Therefore, the observed morphological changes were likely to be the direct result of NO exposure on the endothelial cells.

The earliest NO-induced ultrastructural change observed in this study is an increase in the density of intracytoplasmic pinocytic vesicles. Exposure to a higher dose of the NO donor produced further structural changes including ballooning of mitochondria, increased microvillous formation, doming of endothelial cells, and swelling of the perivascular astrocytic footplate. An increase in microvillous formation that expands the luminal surface area may indicate increased cellular activity regarding uptake and transcellular transportation. Increased endothelial microvilli have been previously reported in the osmotically impaired blood-brain barrier.[15] The hypothesis of NO-induced disturbance of the blood-brain barrier may be supported by the observation of a coexisting increase in the density of cytoplasmic pinocytic vesi-

cles. An increasing number of these vesicles reflects enhanced cellular transport activity, which may lead to increased permeability of cerebral microvessels and, in the extreme state, may cause impairment of the blood-brain barrier. Endothelial cell activation (increase in vesicle number and vacuole formation) and neurogenic plasma extravasation have been previously observed in microvessels of the dura mater following electrical trigeminal ganglion stimulation, which provides an animal model for migraine.[16] Although our pathological studies implied an increase in cerebral vascular permeability, we could not demonstrate any leakage of macromolecule from pial vessels in the fluorescein study. Whether or not the blood-brain barrier is normal during the attack of migraine is still debatable. In this experiment, we demonstrated that the NO-induced pathological changes were more pronounced in animals receiving PCPA pretreatment. This observation indicated that endothelial responses to NO are more severe in the hyposerotoninergic state and, thus, provided further evidence in support of the role of 5-HT depletion on facilitation of the NO response.

The relationship between 5-HT and NO in the pathogenesis of migraine has been previously mentioned. Fozard suggested that 5-HT, via activation of 5-HT_{1B}-5-HT_{1C} receptors on endothelial cells, might stimulate the release of NO. Liberated NO would, by directly activating sensory neurons, induce neurotransmitter release, plasma extravasation, pain, and hyperalgesia.[17] Our results indicate that besides stimulating NO release, an abnormality in the central 5-HT condition can also enhance the vascular response to NO, resulting in NO supersensitivity. The mechanism underlying the instability of the 5-HT system in migraine is still unclear. One possible mechanism is an abnormality in the control of calcium flux, which leads to inappropriate 5-HT release, as has previously been proposed in cases of familial hemiplegic migraine.[18] Observation of excessive dilatation of intraplatelet canaliculi in platelets taken from patients with migraine after physical activation indirectly implied an abnormal 5-HT secreting mechanism in this condition.[19]

In conclusion, the present study showed that meningeal and cerebral microvessels undergo structural and functional changes after exposure to an excessive dose of NO. These changes can be enhanced by prior depletion of 5-HT. Based on these findings, we suggest that hyposerotonin is a possible mechanism underlying the NO supersensitivity previously proposed to exist in patients with migraine.

Acknowledgment: Appreciation is expressed to the Thailand Research Fund for their financial support for this research.

REFERENCES

1. Olesen J, Thomsen LL, Lassen LH, Olesen IJ. The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia*. 1995;15:94-100.
2. Gallai V, Floridi A, Mazzotta G, et al. L-arginine/nitric oxide pathway activation in platelets of migraine patients with and without aura. *Acta Neurol Scand*. 1996;94:151-160.
3. Stepien A, Chalimoniuk M. Level of nitric oxide-dependent cGMP in patients with migraine. *Cephalalgia*. 1998;18:631-634.
4. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, et al. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia*. 1998;18:27-32.
5. Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, van Kempen GM, Pennings EJ, Bruyn GW. Serotonin metabolism in migraine. *Neurology*. 1989;39:1239-1242.
6. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Serotonin and histamine. In: Cooper JR, Bloom FE, Roth RH, eds. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. New York, NY: Oxford University Press; 1991:338-380.
7. Berger RJ, Zuccarello M, Keller JT. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat dura mater. *Neuroreport*. 1994;5:519-521.
8. Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport*. 1993;4:1027-1030.
9. Bellantonio P, Micieli G, Bizzi MG, et al. Hemodynamic correlates of early and delayed responses to sublingual administration of isosorbide dinitrate in migraine patients: a transcranial Doppler study. *Cephalalgia*. 1997;17:183-187.
10. Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Parsons AA. Enhanced nitric oxide release during cortical spreading depression following infusion of glyceryl trinitrate in the anaesthetized cat. *Cephalalgia*. 1997;17:159-163.

11. Thomsen LL, Brennum J, Iversen HK, Olesen J. Effect of a nitric oxide donor (glyceryl trinitrate) on nociceptive thresholds in man. *Cephalalgia* 1996;16:169-174.
12. Griffiths LR, Nyholt DR, Curtain RP, Goadsby PJ, Brimage PJ. Migraine associations and linkage studies of an endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene polymorphism [published correction appears in *Neurology*. 1997;49:1489]. *Neurology*. 1997;49:614-617.
13. Sarchielli P, Tognoloni M, Russo S, et al. Variations in the platelet arginine/nitric oxide pathway during the ovarian cycle in females affected by menstrual migraine. *Cephalalgia*. 1996;16:468-475.
14. Anthony M, Hinterberger H, Lance JW. The possible relationship of serotonin to the migraine syndrome. *Res Clin Stud Headache*. 1969;2:29-59.
15. Lossinsky AS, Vorbrodt AW, Wisniewski HM. Scanning and transmission electron microscopic studies of microvascular pathology in the osmotically impaired blood-brain barrier. *J Neurocytol*. 1995;24:795-806.
16. Dimitriadou V, Buzzi MG, Theoharides TC, Moskowitz MA. Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. *Neuroscience*. 1992;48:187-203.
17. Foxard JR. The 5-hydroxytryptamine-nitric oxide connection: the key link in the initiation of migraine? *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1995;329:111-119.
18. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, Frants RR, Ferrari MD. Involvement of a Ca^{2+} channel gene in familial hemiplegic migraine and migraine with and without aura. *Headache*. 1997;37:479-485.
19. Sriklaikhachorn A, Manocari S, Govitrapong P, Kasantikul V. Dysfunctions of serotonin system in migrainous patients with analgesic abuse headaches: clues from platelets. *Headache*. 1998;38:45-49.

Reprint of the Published Article:
Title:

Can hyposerotonin be the cause of nitric oxide supersensitivity in migraine?

Cephalalgia 1999;19:342-3.

Cephalalgia

An International Journal of Headache

VOLUME 19
NUMBER 4
MAY 1999

EDITORIAL COMMENTARY

199 Platelet nitric oxide metabolites in migraine—G D'Andrea; Nonsteroidal anti-inflammatory agents—A Pradalier; Cardio- and cerebrovascular safety of subcutaneous sumatriptan—ELH Spierings

ORIGINAL ARTICLES

201 PC Honkoop, MJ Sorbi, GLH Cedaert, ELH Spierings: High-density assessment of the IHS classification criteria for migraine without aura: a prospective study

207 MB Russell, S Ostergaard, L Bendtsen, J Olesen: Familial occurrence of chronic tension-type headache

211 DD Mitsikostas, AM Thomas: Comorbidity of headache and depressive disorders

218 T Shimomura, F Murakami, K Kotani, S Ikawa, S Kono: Platelet nitric oxide metabolites in migraine

223 S O'Quinn, RL Davis, DL Cutterman, GD Pait, AW Fox: Prospective large-scale study of the tolerability of subcutaneous sumatriptan injection for acute treatment of migraine

232 The Diclofenac-K/Sumatriptan Migraine Study Group: Acute treatment of migraine attacks: efficacy and safety of a nonsteroidal anti-inflammatory drug, diclofenac-potassium, in comparison to oral sumatriptan and placebo

CASE REPORTS

241 PA Kowacs, FJ Piovesan, CE Tatsui, MC Lange, LC Ribas, LC Werneck: Prolonged migraine aura without headache arrested by sumatriptan. A case report with further considerations

243 M De Marinis, JP Giraldi, A de Pro, S Rinalduzzi, G De Benedetti, A Mollicone, N Accomero: Migraine and ocular pain in "glaucoma suspect"

248 LETTER TO THE EDITOR

250 ANNOUNCEMENTS

9TH CONGRESS OF THE IHS

251 Abstracts

POSTER PRESENTATIONS

Session I

Clinical
- Migraine A1

Pathophysiology
- Migraine E1

I-E1-1

Activation of the coagulation system in migraine with aura. R Hering-Hanit, Z Friedman, I Schlesinger, M Ellis. Headache Unit, Department of Neurology, Hemostasis Laboratory and Division of Transfusion Medicine, Meir General Hospital, Kfar Sava, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Israel

Background and objectives. Prothrombin factor 1.2 (F1.2) is a degradation product of prothrombin. Its plasma level is raised in patients with hypercoagulable states. Measurements of plasma F1.2 have shown it to be a sensitive and specific marker of ongoing thrombin generation. Thus it may serve as an indicator of activation of the clotting cascade. Since a hypercoagulable state has been purported to be present in migraineurs, and previous studies have shown equivocal results, we determined the plasma F1.2 levels in patients with migraine with and without aura. *Methods.* Levels of F1.2 were measured by the ELISA technique in 35 migraine patients, 22 with migraine with aura and 13 with migraine without aura, and in 24 healthy volunteers. All subjects were screened for a deficiency of protein C, protein S or antithrombin III, the presence of activated protein C resistance and of anticardiolipin antibodies. *Results.* All healthy volunteers had normal F1.2 blood levels (<1.1 nmol/L). Of the 35 migraine patients, 11 had elevated F1.2 levels (between 1.25–3.5). All of these suffered from migraine with aura. *Conclusions.* Of the 22 patients with migraine with aura, 11 (50%) had elevated F1.2 levels, while all those suffering from migraine without aura had normal F1.2 levels. F1.2 levels may be utilized to differentiate between migraine with and without aura. The finding that only half of the migraine with aura patients had elevated F1.2 levels may be accounted for by the fact that migraine with aura is not a single entity. Subgroups may be defined, such as CADASIL and familial hemiplegic migraine.

I-E1-2

Processing speed of migraineurs in fast visual categorization. G Geraud, A Aubertin, M Fabre-Thorpe, N Fabre. CNRS-UMR 5549 et Service de neurologie, CHU Rangueil, 31403 Toulouse, France

Objectives. The visual cortex of migraineurs could be hypersensitive. To evaluate the speed of visual processing in tasks of different complexity, we used the protocol described by Thorpe et al. (1996) in which human subjects must find an animal in photographs shown very briefly (20 ms). EEG differential cerebral activity between target and non-target trials develops from 150 ms after stimulus onset and can be used to measure processing delay. *Methods.* The delay of visual processing was evaluated in 8 migraineurs (including 3 with aura) and 9 non-headache controls via this complex visual categorization task. Moreover, as a recent study suggested that acceleration of the visual processing in migraineurs was only apparent for low-level visual tasks, we also tested the two populations on a simple visual categorization task (squares vs circles). Faster visual processing could be reflected by reduced behavioral reaction time (RT) in migraineurs and/or reduced latency of the differential cerebral activity. Therefore, for each categorization task, the behavioral performance and associated EEG differential activity of migraineurs and controls were processed and compared. *Results.* Behavioral analysis showed that all subjects were more accurate (97% correct vs 91%) and responded faster (mean RT: =445 vs 497 ms) in the simple task. Comparing the performance of control subjects and migraineurs, or the performance of migraineurs with or without aura, no difference was observed in either the accuracy rate or the speed of response. The analysis of the differential cerebral activity between target and non-target trials showed that for each task, this activity appears and develops from 150 ms after stimulus onset. The two curves (corresponding to the simple and complex tasks) superimpose perfectly until 220 ms post-stimulus, when a large differential additional wave appears in the simple task. When the EEG is analyzed separately in each task for controls and migraineurs, the latency, slope and amplitude of the differential curves are similar for the two populations, supporting the idea that the speed of the early visual processing involved in performing the tasks is identical. *Conclusions.* These data clearly show that, at least during interictal periods, the feed-forward visual processing along the ventral visual pathway is not accelerated in migraineurs (with or without aura). However, no conclusion can be drawn on possible visual processing specificities in migraineurs that would affect feed-back loops, inhibitory processes or interactions between the ventral and dorsal visual pathways.

I-E1-3

Can hyposerotonin be the cause of nitric oxide supersensitivity in migraine? A Srikiatkhachorn, S Anuntasethakul, S Fanmuay, V Kasantikul. Departments of Physiology and Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Objectives. Although the mechanism underlying nitric oxide (NO) supersensitivity in migraine is still unclear, an alteration of the serotonin system is a possible explanation. This study was conducted to investigate the relationship between hyposerotonin and cranial microvascular responses to NO. *Materials and methods.* Wistar rats were divided into control and hyposerotonin groups. Serotonin was depleted by intraperitoneal injection with 300 mg/kg of para-chlorophenylalanine (PCPA), a tryptophan hydroxylase inhibitor. Three days after PCPA-pretreatment, animals were prepared for assessment of NO-induced vasomotor response using glyceryl trinitrate (GTN: 8–10 mg/kg, i.v.) as a NO-donor. Pial circulation was visualized by intravital fluorescein videomicroscopic technique. Images of vessels at 0, 5, 15, 30 and 60 min post-GTN infusion were digitized and measured. At the end of monitoring, rat brains were removed for ultrastructural study of brain microvessels. *Results.* Infusion of GTN produced dose-dependent pial arteriolar dilatation. This vasodilator effect was significantly increased in PCPA-treated groups, especially at 30 and 60 min. Percentage changes from baseline diameter 30 min after 8 mg/kg GTN infusion were 42.5 ± 3.1 and 16.8 ± 2.7 for hyposerotonin

and control groups, respectively ($p<0.001$). Electron microscopic study revealed that exposure to NO-donor produced considerable changes in cerebral microvessels, characterized by focal ballooning of endothelial cells, increased microvillous formation and increased endothelial pinocytosis. These anatomical changes were significantly more prominent in the hyposerotonin group. *Conclusions.* Hyposerotonergic conditions can facilitate the NO-induced physiological and pathological responses in meningeal and cerebral microvessels. Therefore, alteration of the serotonin system is a possible explanation of NO supersensitivity observed in migraine patients.

I-E1-4

Increased brain serotonin synthesis capacity in migraine without aura. S Chansiwadi, O Chugani, K Nimura, O Muzik, M Fakhouri, M Lee, H Chugani. Wayne State University, Detroit, MI, USA

Objectives. To analyze levels of and patterns of brain serotonin synthesis capacity in patients with migraine and normal volunteers. The effect of prophylactic migraine medication was also investigated. *Materials and methods.* Brain serotonin synthesis capacity was measured with positron emission tomography (PET) using the tracer alpha [C-11] methyl L-tryptophan ([C-11] AMT) in migraine patients. We studied 11 women (age 33 ± 7.7 years) with a diagnosis of migraine headaches according to International Headache Society criteria and 8 healthy women (age 29 ± 9.2 years). Five patients underwent two PET scans before and after prophylactic therapy. *Results.* Serotonin synthesis capacity (K-complex) values in migraine patients were significantly higher than those measured in control subjects throughout the brain ($p=0.016$). Mean K-complex for the whole brain was 0.0054 ± 0.0003 ml/g/min in control subjects and 0.0077 ± 0.0020 ml/g/min for patients with migraine. The regional pattern did not differ between the groups. However, the K-complex for the whole brain for the subgroup of migraine patients with aura ($n=3$) was not significantly different from the control group ($p=0.32$). In patients with scans before and after treatment with propranolol or nadolol, a trend of increased whole brain K-complex following drug therapy was found ($p=0.06$). *Conclusions.* Our findings of increased brain serotonin synthesis capacity in migraine patients are consistent with previous reports of systemic alteration of serotonin metabolism in patients without aura. We further suggest that the mechanism of action with beta-adrenergic antagonists for migraine prophylaxis may involve regulation of serotonin synthesis.

I-E1-5

Antiphospholipid antibodies (APA) in migraine with aura. D Farinini[1], D Santolaci[1], M Ponzari[1], G Regesta[1], G Colla[2], F Castelli[2]. Department of Neurology—Headache Center[1], First Analysis Laboratory[2], San Martino Hospital, Genova, Italy

Objective. Correlation between APA and migraine with aura. *Materials and methods.* We have measured antiphospholipid antibody levels in a series of 50 migraine with aura (according to IHS criteria) and 50 control patients. The migraine patients were 13 men (25%) and 37 (74%) women, mean age 32.4 (range: 16–47, SD: 8.2). The patients in the control group were 17 men (34%) and 33 women (66%), mean age 35.61 (range: 18–50, SD: 9.4). *Results.* Low positive antiphospholipid antibody levels were found in only two patients with migraine with aura and in one control. *Conclusions.* Antiphospholipid antibodies have been observed in small series of migraine patients. These antibodies are recognized markers for an increased risk of thrombosis. There appears to be no association between the presence of antiphospholipid antibodies and migraine with aura. They are not involved in the pathogenesis of migraine complications.

I-E1-6

Unilateral headache and trigeminovascular activation in Wallenberg's syndrome. C Cid, J Berciano, J Pascual. Serv. of Neurology, University Hospital "M de Valdecilla", Santander, Spain

Background. The actual role of the central part of the trigeminovascular system in headache pathophysiology is still debatable. *Objective.* To present the case of a patient with Wallenberg's syndrome suffering from unilateral headache accompanied by remarkable trigeminovascular activation. *Case report.* This 37-year-old man came to our hospital due to acute vertigo, lack of coordination of his left extremities, numbness in his right extremities, dysarthria and dysphagia. Examination revealed a left posterolateral bulbar lesion. Cranial MRI showed an acute infarct in the PICA territory, while an occlusion of the left vertebral artery was seen via angiography. Since the beginning of his clinical history, he has complained of continuous headache located anteriorly in the left hemicranium. Headache ranged from moderate to severe and was accompanied by homolateral conjunctival injection, tearing, ptosis and rhinorrhea. Pain did not respond to i.v. analgesics. This symptomatology remains unchanged after 6 months. *Conclusions.* Our case shows that both hemicranial pain and autonomic symptoms can be induced by central damage in the afferent part of the trigeminovascular system.

I-E1-7

Tolerance to nitrates is slow and incomplete in peripheral arteries but fast and complete in cerebral arteries. I Christiansen, HK Iversen, J Olesen. Department of Neurology, Glostrup Hospital, University of Copenhagen, Denmark

Background and objectives. The organic nitrates glyceryl trinitrate (GTN) and isosorbide-5-mononitrate (5-ISMN) have similar mechanisms of action and exert their therapeutic effects through their active metabolite nitric oxide (NO). Long-term exposure to these compounds influences different sections of the vascular bed heterogeneously. Human data on the development of tolerance in different arteries over more than 24 h are lacking. *Materials and methods.* We compared the vascular changes of the middle cerebral, superficial temporal and radial arteries during