Final Report
Submitted to the Thailand Research Fund

Title

Relationship between Serotonin and Nitric Oxide in Control of Trigeminovascular System: Potential Roles in Migraine Pathogenesis

Investigators

Vira Kasantikul, MD[1]
Anan Srikiatkhachorn, MD[1]
Suthiluk Patumraj, PhD[2]
Pansiri Phansuwan-Pujito, PhD[3]
Supang Maneesri, MSc[1]

[1]Department of Pathology and [2]Department of Physiology,
Chulalongkorn Memorial Hospital and Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University and
[3] Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University,
Bangkok, THAILAND

BRG 4080015

Final Report
Submitted to the Thailand Research Fund

Title

Relationship between Serotonin and Nitric Oxide in Control of Trigeminovascular System: Potential Roles in Migraine Pathogenesis

Investigators

Vira Kasantikul, MD[1]
Anan Srikiatkhachorn, MD[2]
Suthiluk Patumraj, PhD[2]
Pansiri Phansuwan-Pujito, PhD[3]
Supang Maneesri, MSc[1]

BRG 4080012

[1]Department of Pathology and [2]Department of Physiology,
King Chulalongkorn Memorial Hospital and Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University and
[3] Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University,
Bangkok, THAILAND

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย
ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างซีโรโตนินและไนตริกออกไซด์ในกระบวนการควบคุมระบบไทรจมินิโนวาสคูลาร์ : บทบาทในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน

Relationship between Serotonin and Nitric Oxide in Control of Trigeminovascular System: Potential Roles in Migraine Pathogenesis

โดย

ศาสตราจารย์ นพ. วีระ กสานติกุล[1]
รองศาสตราจารย์ นพ. อนันต์ ศรีเทียรติขจร[1]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช[2]
รองศาสตราจารย์ ดร. ปานธิรี พันธุ์สุวรรณ์[3]
นางสาวศุภางค์ มณีศรี[1]

[1] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2] ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3] ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญ

หน้า

บทนำ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
วัตถุประสงค์และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 29
วิธีการทดลองและผลการทดลอง 30
1. การศึกษาผลของ nitric oxide ต่อระบบการควบคุมหลอดเลือดสมอง 31
2. การศึกษาผลของ nitric oxide ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดสมอง 39
3. การศึกษาผลของ nitric oxide ต่อระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง 50
4. การศึกษาผลของ serotonin ต่อการออกฤทธิ์ของ nitric oxide ที่หลอดเลือดสมอง 59
5. การศึกษาผลของ serotonin ต่อการแสดงออกของ Fos ในเซลล์ประสาทซึ่งกระตุ้นโดย nitric oxide 72
สรุปผลการศึกษา 75
วิเคราะห์ผล 76
เอกสารอ้างอิง 83
การเผยแพร่ผลงานวิจัย 96
1. การนำเสนอ (presentation) ผลงานวิจัย 97
2. การตีพิมพ์ผลงานวิจัย 99

INTRODUCTION AND REVIEW OF LITERATURE

- Introduction
- Review of Literatures
  - Cranial pain sensitive structure
  - Trigeminal system and pain perception
  - Cellular physiology of trigeminal caudalis neurons
  - Projection from trigeminal nuclear brainstem complex
  - Trigeminovascular system and pathogenesis of vascular headache
  - Cerebral vessels: anatomy and physiology of endothelial cells
  - Physiology of blood-brain barrier
  - Nitric oxide: biochemistry and role in cerebrovascular control
  - Nitric oxide and migraine pathogenesis
  - Serotonin and migraine pathogenesis
  - Relationship between serotonin and nitric oxide

บทนำ:

ระบบการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด (vascular tone) และการไหลของเลือดที่เลี้ยงสมอง (cerebral blood flow) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เกี่ยวข้องกับส่วนต่างๆของระบบประสาทเป็นจำนวนมาก การเปลี่ยนแปลงตลอดจนความผิดปรกติของกระบวนการดังกล่าว เป็นผลให้เกิดภาวะต่างๆทางประสาทวิทยา เช่น โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) ซึ่งเป็นโรคทางสมองที่ก่อให้เกิดความทุพพลภาพที่พบได้บ่อย หรือกลุ่มอาการปวดศีรษะที่เป็นผลจากหลอดเลือด (vascular headache) เช่น โรคปวดศีรษะไมเกรน (migraine) เป็นต้น

โรคปวดศีรษะไมเกรนเป็นปัญหาทางประสาทวิทยาที่พบได้บ่อย โดยมีอุบัติการณ์ในประเทศต่างๆ ประมาณร้อยละ 8 ในประชากรเพศชาย และร้อยละ 20 ในประชากรเพศหญิง แม้ว่าโดยทั่วไปภาวะนี้มักจะไม่ทำให้ผู้ป่วยเกิดความทุพพลภาพถาวรที่เป็นภาวะที่ทำให้เกิดความทุกข์ทรมานแก่ผู้ป่วย เนื่องจากอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้นมีความรุนแรงค่อนข้างมาก และเกิดซ้ำเป็นครั้งคราว (episodic) ซึ่งอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราวดังกล่าวทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจค่อนข้างมาก เนื่องจากการขาดงาน ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการศึกษาความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เป็นผลจากภาวะนี้ พบว่าจากผู้ป่วยทั้งสิ้นประมาณ 6 ล้านคน จะก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในมูลค่าถึงปีละ 1.4 พันล้านเหรียญสหรัฐ หรือประมาณ 224 เหรียญสหรัฐ/คนปี (de Lissovoy and Lawson, 1994) อาการและอาการแสดงที่สำคัญของภาวะนี้ ได้แก่ อาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้นเป็นครั้งคราว ร่วมกับอาการคลื่นไส้ อาเจียน ตามัวหรือการมองภาพที่ผิดปรกติ ในบางรายอาจมีอาการนำ (aura) ที่บ่งชี้ถึงความผิดปรกติในการทำงานของระบบประสาท เช่น อาการอ่อนแรงหรือชาครึ่งซีก การสูดที่ผิดปรกติ เป็นต้น พยาธิกำเนิดของภาวะนี้ชี้ว่าน่าจะเป็นผลจากความผิดปรกติในระบบการควบคุมการรับความเจ็บปวด และระบบการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะของอาการปวดศีรษะเกี่ยวข้องกับการเต้นของชีพจร (pulsating headache) รวมถึงการพบการเปลี่ยนแปลงในอัตราการไหลของเลือดในหลอดเลือดบริเวณศีรษะ ขณะที่ผู้ป่วยเกิดอาการปวด (Sakai and Mayer, 1978) นอกจากนี้ยาหลายชนิดที่มีผลกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstrictive agents) เช่น ยาในกลุ่ม ergot alkaloids และอนุพันธุ์ ยังมีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวดศีรษะในภาวะนี้ ทั้งๆที่ไม่มีฤทธิ์เป็นยาลดปวด (analgesic effect)

ปัจจุบัน ได้มีความก้าวหน้าเกี่ยวกับสรีรวิทยาของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมหลอดเลือดของสมอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความรู้เกี่ยวกับบทบาทของสารเคมี (chemical messenger) ชนิดต่างๆในกระบวนการดังกล่าว ผลการศึกษาในอดีตบ่งชี้ว่าการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดในโพรงกะโหลกศีรษะอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างระบบประสาทและกลไกเฉพาะที่ของหลอดเลือด ความก้าวหน้าที่สำคัญในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา คือ สารสื่อประสาทชนิดต่างๆที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดทำงานโดยผ่านกลไกที่อาศัยเซลล์เอนโดธีเลียม (endothelium dependent mechanism) กล่าวคือกระตุ้นให้เซลล์เอนโดธีเลียมปลดปล่อยสารเคมีที่ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด เป็นผลให้หลอดเลือดขยายตัว (vasodilation) สารเคมีนี้เรียกกันในระยะแรกว่า endothelium derived relaxing factor (EDRF) และเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่าสารดังกล่าวคือ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide : NO)

เนื่องจากหลอดเลือดขนาดต่างๆภายในศีรษะ มีใยประสาทที่ทำหน้าที่รับความรู้สึกเจ็บปวดมาสิ้นสุดเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อหลอดเลือดเหล่านี้จึงสามารถทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ ไม่ว่าสิ่งกระตุ้นนั้นจะมีพยาธิสภาพที่ซับซ้อน เช่น การอักเสบของหลอดเลือด (vasculitis), การดึงรั้ง (traction), การ

แผลปรี (dissection) หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงในการทำงาน (functional change) เช่น การเกิดการอักเสบปลอดเชื้อ (neurogenic sterile inflammation) ในกรณีของไรปวดศีรษะไมเกรน เป็นต้น จากหลักฐานที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าไนตริกออกไซด์น่าจะมีบทบาทในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะที่เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ในการศึกษาของ Iversen และคณะพบว่าการให้ nitroglycerin สามารถกระตุ้นให้ผู้ป่วยไมเกรนเกิดอาการปวดศีรษะที่มีลักษณะต่างจากปกติ (Thompsen et al, 1994) ผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าผู้ป่วยไมเกรนมีความไวต่อไนตริกออกไซด์มากกว่าปกติ (supersensitivity) และกลุ่มผู้ศึกษาได้ตั้งสมมติฐานว่า ความผิดปกติในการตอบสนองต่อไนตริกออกไซด์ น่าจะเป็นกลไกที่สำคัญในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะในภาวะนี้ (Olesen et al, 1993)

ความผิดปกติทางชีวภาพที่สำคัญอีกประการหนึ่ง และที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าน่าจะมีบทบาทในพยาธิกำเนิดของไรปวดศีรษะไมเกรนคือ การเปลี่ยนแปลงของซีโรโตนิน (serotonin, 5-HT) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญทั้งในระบบปรับเปลี่ยนการรับความเจ็บปวด (pain modulating system) และระบบการควบคุมหลอดเลือด มีหลักฐานจำนวนมากยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทนี้ในภาวะไมเกรน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขณะที่ผู้ป่วยเกิดอาการปวดศีรษะ กล่าวคือจะมีการลดต่ำลงของระดับซีโรโตนินในเกล็ดเลือดร่วมกับการเพิ่มขึ้นของระดับซีโรโตนินในพลาสมา (Ferrari and Saxena, 1993) นอกจากนี้ยาที่ออกฤทธิ์กระตุ้นตัวรับ (receptor agonist) ของซีโรโตนินชนิด 5-$HT_{1B/1D}$ เช่น sumatriptan ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เกิดการหดตัวของผนังหลอดเลือด ให้ผลดีในการบรรเทาอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้น การลดต่ำลงของซีโรโตนินในขณะที่เกิดอาการปวดศีรษะไมเกรน อาจมีความสัมพันธ์กับความไวผิดปกติในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อไนตริกออกไซด์ที่พบในผู้ป่วยกลุ่มนี้

แม้ว่าจากการศึกษาที่ผ่านมาจะให้รายละเอียดเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในภาวะไมเกรน แต่ความผิดปกติที่พบยังไม่สามารถอธิบายพยาธิกำเนิดของภาวะดังกล่าวได้ทั้งหมด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดเป็นขั้นตอนสำคัญในกลไกของการเกิดภาวะปวดศีรษะ และทั้งไนตริกออกไซด์ และซีโรโตนินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการดังกล่าว โครงการการวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสารเคมีทั้งสอง ต่อระบบการควบคุมหลอดเลือดสมอง และระบบการรับความเจ็บปวด โดยศึกษาทั้งการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของหลอดเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ทั้งนี้เพื่ออธิบายถึงพยาธิสรีรวิทยาของโรคปวดศีรษะ และเป็นแนวทางในการรักษาต่อไป

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แม้ว่าโรคไมเกรนจะเป็นโรคที่มีคุณภาพชีวิตการดูแล แต่ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบโดยแน่ชัด จากลักษณะบางประการของอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาการปวดที่เป็นจังหวะตามชีพจร ประกอบกับอวัยวะที่เป็นสาเหตุของอาการปวดน่าจะเกิดจากหลอดเลือดในบริเวณศีรษะ จากหลักฐานทางประสาทกายวิภาคแสดงให้เห็นว่า หลอดเลือดในโพรงกะโหลกศีรษะที่เส้นประสาทรับสัมผัสมาสิ้นสุดเป็นจำนวนมาก ซึ่งยืนยันว่าหลอดเลือดบริเวณศีรษะสามารถทำให้เกิดอาการปวดได้ ใยประสาทที่ไปยังหลอดเลือดเหล่านี้ประกอบขึ้นจากส่วนของเส้นประสาท trigeminal และบางส่วนของเส้นประสาทไขสันหลังระดับคอ (cervical spinal nerve) ซึ่งทำหน้าที่นำกระแสประสาทเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางโดยผ่านกลุ่มเซลล์ที่สำคัญ คือ กลุ่มเซลล์ trigeminal nucleus caudalis นอกเหนือจากการนำกระแสประสาทเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง เส้นประสาทรับความรู้สึกยังมีหน้าที่ในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดด้วย การศึกษาทาง immunohistochemistry พบว่าภายในปลายประสาทรับสัมผัสที่ไปยังหลอดเลือดมีสารสื่อประสาทในกลุ่มนิวโรเปปไทด์ชนิดต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) หรือ neurokinin A (NKA) (Edvinsson and Goadsby, 1995) ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีบทบาทในการขยายหลอดเลือด (vasodilating effect) การศึกษาทางสรีรวิทยาโดยการกระตุ้นเส้นประสาทหรือปมประสาท trigeminal ด้วยไฟฟ้าพบว่า สามารถทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดสมองร่วมกับการเพิ่มขึ้นของ SP และ CGRP ในเลือดที่เป็นจากหลอดเลือดดำที่คอ (jugular vein) ในขณะที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของสารสื่อประสาทดังกล่าวในเลือดดำบริเวณอื่น เช่น หลอดเลือดที่โคนขา (femoral vein) (Goadsby et al. 1988) นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มของสาร vasoactive intestinal polypeptide (VIP) ซึ่งเป็นสารที่พบในใยประสาท parasympathetic ร่วมด้วย การค้นพบดังกล่าวบ่งชี้ว่า ภายในก้านสมองมีวงจรประสาทที่เชื่อมระบบรับความรู้สึกจากหลอดเลือดที่ผ่านเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางทางเส้นประสาท trigemial และเส้นประสาทไขสันหลัง เข้ากับระบบประสาท parasympathetic ซึ่งอยู่ภายในก้านสมองผ่านทางแขนงของเส้นประสาท facial เรียกวงจรประสาทนี้ว่าระบบ trigeminovascular system

อวัยวะบริเวณกะโหลกศีรษะที่ไวต่อการเกิดอาการปวด (Cranial Pain-Sensitive Structures)

Ray and Wolff ได้ทำการศึกษาที่มีความสำคัญยิ่งต่อความเข้าใจเกี่ยวกับลักษณะการเกิดอาการปวดของโครงสร้างต่างๆบริเวณศีรษะ (Ray and Wolff 1940, Wolff 1963) โดยบันทึกความรู้สึกของผู้ป่วยที่ถูกกระตุ้นที่อวัยวะหรือโครงสร้างต่างๆภายในกะโหลกศีรษะ ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นโดยตรงที่ผิวสมองใหญ่ (cerebral cortex), ependyma ที่บุโพรงสมอง (ventricles), choroid plexus และส่วนใหญ่ของเยื่อสมองชั้น dura, arachnoid และ pia mater รวมทั้งกะโหลกศีรษะที่ได้รับการลอกเยื่อหุ้ม (periosteum) จะไม่ทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ ในขณะที่การกระตุ้นบริเวณ floor ของ anterior และ middle cranial fossa และส่วนของ middle cranial fossa ที่อยู่ใกล้หลอดเลือด middle cerebral artery สามารถทำให้เกิดอาการปวด

อวัยวะที่สามารถทำให้เกิดอาการปวดได้รุนแรงที่สุด คือ หลอดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนต้น (proximal part) ของหลอดเลือดแดงของสมอง (cerebral arteries) และเยื่อหุ้มสมอง (dural arteries) และหลอดเลือดดำขนาดใหญ่ และ venous sinus โดยตำแหน่งของอาการปวดมีความสัมพันธ์กับหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้น อาทิ การกระตุ้นในตำแหน่ง intracranial segment ของหลอดเลือดแดง internal carotid และส่วนต้น (ห่างจาก bifurcation ไม่เกิน 2 เซนติเมตร) ของหลอดเลือดแดง middle และ anterior cerebral ทำให้เกิดอาการปวดบริเวณลูกตา หน้าผาก และขมับด้านนั้น การกระตุ้นหลอดเลือดแดง middle meningeal ทำให้เกิดอาการปวดหลังลูกตา

และหนับ ส่วนการกระตุ้นบริเวณหลอดเลือดแดง vertebral และ basilar จะทำให้เกิดอาการปวดบริเวณท้ายทอย เป็นต้น สำหรับการกระตุ้นหลอดเลือดดำนั้นมักให้อาการปวดที่มีความรุนแรงน้อยกว่าการกระตุ้นหลอดเลือดแดง เช่น การกระตุ้นหลอดเลือดดำ sagittal sinus จะทำให้เกิดอาการปวดบริเวณด้านหน้าและด้านข้าง (fronto-parietal) ของศีรษะ โดยทั่วไปแล้วอาการปวดที่เกิดขึ้นจากอวัยวะที่อยู่ใน anterior และ middle cranial fossa จะมีตำแหน่งค่อนมาทางด้านหน้า กล่าวคือหน้าต่อเส้นที่ลากผ่านใบหูทั้งสองข้าง ส่วนอาการปวดที่เกิดจากอวัยวะใน posterior cranial fossa มักอยู่ทางด้านหลัง อย่างไรก็ตามข้อสังเกตนี้มิใช่ข้อสรุปในทุกกรณี ทั้งนี้เนื่องจากอาการปวดมักจำแหรือแผ่ขยายไปยังด้านอื่นๆ ได้บ่อย

ระบบ trigeminal และการรับความเจ็บปวด (Trigeminal System and Pain Perception)

Peripheral Innervation

กระแสประสาทที่เกิดจากการกระตุ้นตัวรับ nociceptor โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากหลอดเลือดและเยื่อหุ้มสมอง dura ใน anterior และ middle cranial fossa รวมถึงผิวบน (superior surface) ของ tentorium cerebelli จะถูกนำผ่านเส้นประสาท trigeminal (Andres et al 1987, Mayberg et al 1984) ซึ่งเป็นระบบที่มีความสำคัญที่สุดในการรับความรู้สึกเจ็บปวดจากอวัยวะต่างๆ บริเวณศีรษะในมนุษย์ ใยประสาท trigeminal เหล่านี้จะมีความหนาแน่นมากที่สุดที่บริเวณรอบหลอดเลือดของเยื่อ dura และ pia ในตำแหน่งส่วนต้นของหลอดเลือดสมองที่ประกอบเป็น circle of Willis, หลอดเลือดแดง meningeal artery, และ dural sinuses เช่นเดียวกับระบบประสาทรับความเจ็บปวดในส่วนอื่นๆ ของร่างกาย ใยประสาทที่รับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดเหล่านี้ประกอบขึ้นด้วยใยประสาทชนิด C-fiber และ Aδ-fiber ใยประสาทชนิด C เป็นใยประสาทขนาดเล็กและไม่มีปลอก myelin ห่อหุ้ม ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเกิดความรู้สึกปวด (aching) หรือแสบร้อน (burning) ในขณะที่ใยประสาทชนิด Aδ ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าและมีปลอก myelin ห่อหุ้มจะทำหน้าที่เกี่ยวกับความรู้สึกเจ็บ (sharp pain) ใยประสาทเหล่านี้สามารถย้อมพิต immunoreactivity ต่อสาร algogenic peptides บางชนิด ได้แก่ calcitonin-gene related peptide (CGRP) และ substance P (SP) ซึ่งเป็นลักษณะของใยประสาท nociceptive afferent (Nozaki et al 1990) และเช่นเดียวกับอวัยวะภายในอื่นๆ ความรู้สึกปวดเป็นความรู้สึกประเภทเดียวที่เกิดขึ้น เมื่อมีการกระตุ้นต่อหลอดเลือดหรือเยื่อหุ้มสมอง ไม่ว่าการกระตุ้นนั้นจะเป็นการดึงรั้ง การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า หรือสารเคมีก็ตาม

ส่วนรับความรู้สึก (sensory portion) ของเส้นประสาทนี้กำเนิดจากเซลล์ในปมประสาท gasserian ซึ่งอยู่บนกระดูก petrous ภายใน middle cranial fossa ปมประสาทนี้ให้แขนงประสาทแยกออกเป็น 3 แขนง คือ ophthalmic, maxillary และ mandibular divisions ophthalmic division ทำหน้าที่รับการกระตุ้นจากผิวหนังและกล้ามเนื้อบริเวณหน้าผาก, จมูก, หนังศีรษะส่วนหน้า, คิ้ว, เปลือกตา และอวัยวะภายในกระบอกตา โดยผ่านทางแขนงทั้งสามคือเส้นประสาท frontal, lacrimal และ nasal nerves สำหรับภายในกะโหลกศีรษะนั้นความรู้สึกที่เกิดจากเยื่อหุ้มสมองชั้น dura บริเวณโพรงกะโหลกศีรษะส่วนหน้าและส่วนกลางจะถูกนำโดยผ่านแขนง ophthalmic และ maxillary นอกจากนี้ใยประสาทจาก ophthalmic division ยังรับความรู้สึกจากหลอดเลือดแดงในข้างเดียวกัน (ipsilateral) ของ circle of Willis ส่วนหลอดเลือดบริเวณกึ่งกลางสมอง เช่น หลอดเลือดแดง anterior cerebral หรือหลอดเลือดดำ superior sagittal sinus นั้น จะได้รับใยประสาทจากเซลล์ในปมประสาท gasserian ทั้งสองข้าง สำหรับกระแสประสาทที่นำความรู้สึกเจ็บปวดจากบริเวณท้ายทอยและเยื่อ dura ในบริเวณโพรงกะโหลกศีรษะส่วนหลัง (Kimmel 1961) ตลอดจนอาจรวมไปยังหลอดเลือดในระบบ

vertebrobasilar นั้นเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางโดยผ่านเส้นประสาทไขสันหลังส่วนคอคู่ที่ 2 และ 3 (Keller et al 1981)

ตัวรับ nociceptor ที่เป็นส่วนปลาย (free-nerve ending) ของใยประสาท trigeminal มีลักษณะทางสรีรวิทยาเช่นเดียวกับตัวรับ nociceptor ในระดับของไขสันหลัง กล่าวคือ เป็นตัวรับที่มีความไวต่อการกระตุ้นทั้งโดยแรงกล สารเคมี และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในภาวะปรกติตัวรับ nociceptor ภายในกะโหลกศีรษะนี้จะไม่มีการส่งกระแสประสาท แต่จะตอบสนองต่อเมื่อถูกกระตุ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงในระดับของ potassium และ hydrogen ion รวมไปถึงสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบต่างๆ และ growth factors ส่วนเหล่านี้จะกระตุ้นให้ผนังของตัวรับ nociceptor เกิด depolarization ด้วยกลไกที่แตกต่างกัน อาทิ potassium ion จะแพร่ผ่าน non-gated channel โดยตรง ในขณะที่ hydrogen ion จะจับกับ capsaicin-sensitive vanilloid receptor (VR1) และ acid-sensitive ion channel receptor (ASIC) เมื่อใยประสาท nociceptor เกิด depolarization จะกระตุ้นให้ voltage-gated calcium channel ที่ผนังปลายประสาทเปิดเป็นผลให้มีการเคลื่อนที่ของ calcium ion ผ่านเข้าสู่ภายในตัวรับ nociceptor ปริมาณ calcium ion ที่สูงขึ้นในปลายประสาทจะกระตุ้นกระบวนการปลดปล่อยสาร peptide กลุ่ม tachykinin ออกจากปลายประสาท และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบปลอดเชื้อ (sterile neurogenic inflammation) นอกจากนี้ในบริเวณที่มีการอักเสบยังมีการกระตุ้นให้เซลล์ชนิดต่างๆ ในกระแสเลือด เช่น mast cell หรือ platelets ปลดปล่อยสารภายใน cytoplasm เช่น histamine, serotonin เป็นต้น กระบวนการปลดปล่อยสารเหล่านี้จากแหล่งต่างๆเหล่านี้จะทำให้บริเวณที่มีการกระตุ้น nociceptor กว้างออก ตลอดจนเป็นผลให้ความไวของตัวรับ nociceptor เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเรียกกลไกนี้ว่า peripheral sensitization ซึ่ง ion channel ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงความไวของตัวรับ nociceptor นี้ ได้แก่ tetrodotoxin-resistant sodium channel (TTX-R I_{Na}) ชนิดพิเศษซึ่งจำเพาะต่อ nociceptor เรียกว่า SNS (sensory-neuron-specific) Na channel (Akopian et al 1996)

ความเชื่อดั้งเดิมเกี่ยวกับกลไกการเกิดอาการปวดในภาวะปวดศีรษะไมเกรนนั้น เชื่อว่าอาการปวดเป็นผลจากการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) ทำให้เกิดการดึงรั้ง (stretching) ของหลอดเลือด หรือที่รู้จักกันในชื่อ "vascular theory" (Wolff 1963) ความเชื่อนี้มีรากฐานมาจากลักษณะทางคลินิกที่พบว่าอาการปวดในภาวะนี้มีลักษณะเป็น pulsating คือเต้นตามชีพจร นอกจากนี้อาการดีขึ้นได้โดยการกดที่หลอดเลือดแดง superficial temporal artery ที่บริเวณหน้าหู หรือการใช้ยาที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstrictive agents) เช่นจากกลุ่ม ergot alkaloids เป็นต้น แม้ว่าสมมติฐานนี้จะเข้าได้กับอาการทางคลินิกและการศึกษาในระยะต่อมาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของขนาดหลอดเลือดหรือปริมาณเลือดในช่วงอาการปวดศีรษะโดยใช้เทคนิคที่มีความละเอียดมากขึ้นไม่สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว ซึ่งแสดงว่าการขยายตัวของหลอดเลือดเพียงประการเดียวไม่น่าจะสามารถอธิบายกลไกของการเกิดอาการปวดศีรษะในภาวะดังกล่าวได้

ความสัมพันธ์ระหว่างการขยายตัวของหลอดเลือด หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือการกระตุ้นด้วยแรงกล และการเกิดอาการปวดนั้นมีความเข้าใจมากขึ้นในระยะหลัง การศึกษาโดยกระตุ้นให้ใยประสาท nociceptor ด้วยการหยด hypertonic sodium chloride ลงบนหลอดเลือดดำ superior sagittal sinus หรือฉีดเข้าในหลอดเลือดนั้น และศึกษาการตอบสนองของเซลล์ประสาท nociceptive ในปมประสาท trigeminal ต่อการกระตุ้นด้วยแรงกล (mechanical stroking) พบว่าเซลล์ประสาทจะตอบสนองรุนแรงขึ้นภายหลังจากที่ตัวรับ nociceptor นั้นถูกกระตุ้นด้วย hypertonic sodium chloride แล้ว (Strassman et al 1996) การศึกษาโดย Bove and Moskowitz ซึ่งศึกษาการตอบสนองของใยประสาท nociceptive afferent หลังจากการกระตุ้นด้วยสารเคมี พบว่าใยประสาทเหล่านี้จะตอบ

สนองต่อแรงกดใต้และยืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่างแรงกดต่อการเกิดอาการปวด (Bove and Moskowitz 1997) ผลการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนว่าเซลล์ประสาท nociceptive จะมีการตอบสนองต่อแรงกดได้เมื่ออยู่ในภาวะ sensitization และการลด peripheral sensitization น่าจะเป็นเป้าหมายหนึ่งของการพัฒนาวิธีการรักษาอาการปวดศีรษะในภาวะนี้ (Strassman et al 2000)

Central Trigeminal Pathway

ใยประสาท central axon ของเซลล์ในปมประสาท trigeminal จะรวมตัวกันเป็นรากประสาทรับความรู้สึกและผ่านเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางในระดับของ pons จากนั้นจึงสิ้นสุดโดยสัมผัสกับกลุ่มเซลล์ trigeminal brainstem nuclear complex (TNBC) (Mesulinger and Burstein 2000) โครงสร้างของกลุ่มเซลล์ TNBC ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์หลัก 2 กลุ่ม คือ principal sensory nucleus (Vp) และ spinal trigeminal nucleus (Vsp) รูปแบบของการสิ้นสุดของใยประสาท primary afferent ถึงกลุ่มเซลล์ TNBC จะเป็นไปอย่างมีแบบแผน กล่าวคือ ใยประสาทที่มีขนาดใหญ่และเกี่ยวข้องกับความรู้สึกสัมผัส (tactile) หรือแรงกด (pressure) จะสิ้นสุดในระดับที่สูง (rostral) ถึงตำแหน่งของกลุ่มเซลล์ Vp ในขณะที่ใยประสาทที่มีขนาดเล็กลง, มีปลอก myelin ที่บางลง และนำกระแสประสาทได้ช้าจะสิ้นสุดในตำแหน่งที่ต่ำ (caudal) ลงในกลุ่มเซลล์ Vsp (Kerr 1966) กลุ่มของใยประสาท primary afferent ที่ทอดผ่านเพื่อลงมาสิ้นสุดในกลุ่มเซลล์ Vsp นั้นจะรวมกันเป็นวิถีประสาทเรียกว่า spinal trigeminal tract กลุ่มเซลล์ Vsp เป็นกลุ่มเซลล์ประสาทขนาดใหญ่เรียงตัวอยู่ด้านในของ spinal trigeminal tract พบได้ตั้งแต่ระดับใยสันหลังส่วนต้นจนถึงก้านสมองระดับ pons ส่วนต้นของกลุ่มเซลล์ประสาทนี้ต่อเนื่องกับกลุ่มเซลล์ principle sensory nucleus และส่วนท้ายต่อเนื่องกับกลุ่มเซลล์ประสาท substantia gelatinosa ใน dorsal horn ของไขสันหลังระดับคอคู่ที่ 2 กลุ่มเซลล์ Vsp แบ่งออกเป็นกลุ่มเซลล์ย่อย (subnuclei) ได้ 3 กลุ่ม ยังประกอบด้วย กลุ่มเซลล์ subnuclei oralis (Vo), interpolaris (Vi) และ caudalis (Vc) โดยเรียงจากส่วนต้นไปยังส่วนท้ายตามลำดับ กลุ่มเซลล์ Vc เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการเกิดความรู้สึกปวด การศึกษาโดยวิธี electrophysiology โดยการกระตุ้นเยื่อหุ้มสมอง dura ด้วยไฟฟ้า พบว่าสามารถทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ Vc ได้ (Davis and Dostrovsky 1986, Strassman et al 1986) นอกจากตอบสนองต่อการกระตุ้นเยื่อหุ้มสมองแล้ว เซลล์เหล่านี้ยังตอบสนองต่อการกระตุ้นผิวหนังบริเวณใบหน้า, กระบอกตา หรือหน้าผาก ซึ่งแสดงว่าแบบแผนของการเรียงตัวของใยประสาทในระบบนี้มีลักษณะเป็น convergent กลุ่มเซลล์ประสาท Vc อาจเรียกได้ว่าเป็น medullary dorsal horn (MDH) ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มเซลล์นี้มีลักษณะทางกายวิภาคและสรีรวิทยาคล้ายกับกลุ่มเซลล์ใน dorsal horn ของไขสันหลัง กลุ่มเซลล์ย่อย Vc พบตั้งแต่ระดับ obex ของ fourth ventricle ในก้านสมองจนถึงไขสันหลังระดับคอที่ 2 หรือ 3

Olszewski (1950) ได้ศึกษาลักษณะของเซลล์และแบ่งกลุ่มเซลล์ Vc หรือ MDH ออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ marginal ซึ่งอยู่ชั้นนอกสุด, SG และ magnocellular zone ซึ่งอยู่ชั้นในสุด ต่อมา Gobel ได้ใช้วิธีการแบ่งชั้นของเซลล์ตามแนวทางเดียวกับวิธีแบ่งแบบ Rexed และจำแนกกลุ่มเซลล์ Vc ออกเป็น 4 ชั้น โดย lamina I เทียบได้กับชั้น marginal, lamina II เทียบได้กับชั้น substantia gelatinosa และ magnocellular zone เทียบได้กับ lamina III และ IV (Gobel et al 1977) สำหรับ lamina V ซึ่งเป็นส่วน neck ของ dorsal horn ในไขสันหลังนั้น ในระดับของกลุ่มเซลล์ Vc ไม่พบว่ามีขอบเขตหรือความแตกต่างของเซลล์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามในบางครั้งก็มีการแบ่ง lamina V สำหรับกลุ่มเซลล์ Vc (Young 1990) Lamina I ซึ่งอยู่ทางด้านนอกสุดของกลุ่มเซลล์ Vc ทำหน้าที่รับกิ่งสั้นจากใยประสาทที่นำข้อมูลเกี่ยวกับความรู้สึกปวดและอุณหภูมิ จากการศึกษาด้วยวิธี retrograde neuronal

tracing ด้วย horseradish peroxidase พบว่าปลายประสาทรับความรู้สึกที่ไปยังบริเวณใบหน้านี้ central axon มายังชั้นนอกของ Vsp (Hayashi 1985, Jacquin et al 1986) โดยพบหนาแน่นใน substantia gelatinosa ของกลุ่มเซลล์ Vc ใยประสาทที่เข้าสู่ด้านหน่วงดังกล่าวของกลุ่มเซลล์เป็นใยประสาทที่มีสาร neurokinins ได้แก่ substance P (SP) และ calcitonin gene-related peptide (CGRP) ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของใยประสาท nociceptive afferent (Tashiro et al 1991, Boissonade et al 1993) และใยประสาทที่มี CGRP-like immunoreactivity ใน spinal trigeminal tract จะหายไปเมื่อมีการตัดรากประสาท trigeminal (trigeminal retrogasserian rhizotomy) (Henry et al 1996) ในขณะที่ใยประสาทที่มี SP-like immunoreactivity ยังคงหลงเหลือในระดับหนึ่ง ซึ่งแสดงว่าใยประสาท CGRP เกือบทั้งหมดมาจากเส้นประสาท trigeminal ส่วนใยประสาท SP นั้นมีทั้งที่มาจากเส้นประสาท trigeminal และส่วนที่มาจากส่วนอื่นๆในสมอง (Tashiro et al 1991) ความเชื่อมโยงระหว่างเซลล์ในชั้นต้นของกลุ่มเซลล์ Vc และกระบวนการรับทางกระตุ้นรวมใด nociception นั้น ยืนยันโดยการศึกษาระยะหลังซึ่งศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor หลังจากกระตุ้นตัวรับ nociceptor ในเยื่อหุ้มสมอง โดย Nozaki และคณะ (1992a) ได้ทำการศึกษาโดยฉีดเลือดเข้าในช่อง subarachnoid ของลิตัวทดลอง ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นดังกล่าวทำให้มีเซลล์ประสาทใน lamina I ของกลุ่มเซลล์ Vc มีการสร้างโปรตีน Fos เกิดขึ้น (Fos-like immunoreactivity) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดการปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้โดยการตัดเส้นประสาท trigeminal ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าเซลล์ในบริเวณ lamina I ของกลุ่มเซลล์ Vc ทำหน้าที่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย (noxious stimulus) โดยผ่านทางเส้นประสาท trigeminal nerve นอกเหนือจากเซลล์ใน lamina I แล้วเซลล์ในชั้นลึกก็มีบทบาทในกระบวนการนี้ชั้นเดียวกัน กล่าวคือ กระบวนการรับกระแสประสาทที่เกิดจากการกระตุ้นตัวรับ nociceptor ในกล้ามเนื้อ masseter, tooth pulp และเยื่อ dura จะผ่านทางเซลล์ในชั้นลึกของกลุ่มเซลล์ Vsp (Davis and Dostrovsky 1988, Burstein et al 1998)

เซลล์ใน lamina II ทำหน้าที่คล้ายกลุ่มเซลล์ประสาท substantia gelatinosa ของไขสันหลัง กล่าวคือ ทำหน้าที่ปรับเปลี่ยน (modulation) กระแสประสาทที่ผ่านเข้าสู่ dorsal horn ก่อนจะขึ้นสู่ส่วนอื่นๆของระบบประสาทส่วนกลาง ทั้งนี้โดยอาศัยคำสั่งจากสมองส่วนอื่นๆ โดยเฉพาะจากกลุ่มเซลล์ประสาทในก้านสมอง อาทิ nucleus raphe หรือ locus ceruleus รวมไปถึงกระแสประสาทที่ผ่านเข้ามาในไขสันหลังระดับนั้นเอง ส่วน laminae ที่ IV และ V ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (magnocellular layers) ทำหน้าที่เช่นเดียวกับ nucleus proprius ใน dorsal horn ของไขสันหลัง กระแสประสาทที่นำความรู้สึกจับปวดจากบริเวณใบหน้าจะสิ้นสุดลงบนกลุ่มเซลล์ Vc นี้ตลอดแนวความยาว โดยส่วนต้นจะรับสัญญาณประสาทจากบริเวณส่วนกลางของใบหน้าและช่องปาก และส่วนปลายรับสัญญาณประสาทจากบริเวณรอบนอกของใบหน้า (Yokota and Nishikawa 1980)

กลุ่มเซลล์ Vp และ Vsp ตลอดจน spinal trigeminal tract มีการเรียงตัวที่เป็น topographic หรือ somatotopic organization ในแนวของ ventrodorsal direction กล่าวคือ ใยประสาทหรือเซลล์ที่รับสัมผัสจาก mandibular division จะเรียงตัวอยู่ทางด้าน dorsomedial ในขณะที่ใยประสาทจาก ophthalmic division จะสิ้นสุดทางด้าน ventrolateral และ MDH โดยมีส่วนที่มาจาก maxillary division คั่นระหว่างกลาง ดังนั้นหากมีรอยโรคที่ทำให้เกิดการตกเนื่องใยประสาทจากบริเวณกลาง จะทำให้เกิดความผิดปรกติของการรับความรู้สึกที่มีลักษณะเป็นวงแผ่ขยายจากรอยโรค นอกจากรับใยประสาทจากเส้นประสาท trigeminal nerve แล้ว กลุ่มเซลล์ Vsp ยังรับสัมผัสจากใยประสาทอื่นๆเป็นจำนวนมาก ได้แก่ ใยประสาทบางส่วนจากเซลล์ในปมประสาท geniculate ganglion ของเส้นประสาท facial, ปมประสาท superior ganglion ของเส้นประสาท glossopharyngeal และ vagus

nerves, รากประสาทรับความรู้สึกของเส้นประสาทไขสันหลังส่วนคอคู่ที่ 2 และ 3 รวมไปถึงใยประสาทที่นำความรู้สึกเจ็บปวดจากโพรงจมูก, ช่องปาก, ช่องหลังกระบอกตา, และหลอดเลือดแดง internal carotid โดยเฉพาะส่วน intrapetrous และ intracranial portion ซึ่งผ่านมาทางเส้นประสาท vidian และ greater superficial petrosal nerves (GSPN) ซึ่งเป็นแขนงของเส้นประสาท facial nerve นอกจากนี้ในระยะหลังยังพบว่ากลุ่มเซลล์ TBNC มิได้ทำงานในลักษณะที่เป็นตำแหน่งรับ primary afferent และส่งผ่านข้อมูลไปยังสมองส่วนที่สูงขึ้นไปเท่านั้น แต่ยังมีการติดต่อกันระหว่างกลุ่มเซลล์ย่อยใน TNSC ด้วย เช่น มีใยประสาทจากกลุ่มเซลล์ Vc ไปยัง Vo (Jacquin et al 1990)

การทำงานของเซลล์ประสาทใน trigeminal subnucleus caudalis

การทำงานของเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ Vc มีลักษณะคล้ายคลึงกับการทำงานของเซลล์ประสาทใน dorsal horn ของไขสันหลัง (Dostrovsky and Strassman 2000) โดยอาศัยลักษณะของการตอบสนองทำให้สามารถจำแนกเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์นี้ออกเป็น low-threshold mechanoreceptive (LTM), thermoreceptive, และ nociceptive neurons ขึ้นอยู่กับความสามารถในการตอบสนองต่อประเภทของสิ่งกระตุ้นในบริเวณรับสัมผัส (receptive field) ของเซลล์นั้น สำหรับเซลล์ประสาท nociceptive ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น nociceptive-specific (NS) และ wide-dynamic-range (WDR) neurons เซลล์ NS ซึ่งอยู่ใน lamina ที่ I, II และ V รับใยประสาทจากเส้นประสาทขนาด Aδ และ C และทำหน้าที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นที่เป็น noxious stimulation เท่านั้น ในขณะที่เซลล์ WDR รับใยประสาททั้งที่เป็น nociceptive fiber (Aδ และ C fibers) และที่เป็น non-nociceptive fiber (Aβ fiber) และมีคุณสมบัติที่สามารถตอบสนองทั้งต่อแรงกดที่มีความรุนแรงต่ำ (innocuous mechanical stimulation) จนถึง noxious stimulation โดยจะมีการส่งกระแสประสาทด้วยความถี่ที่สูงขึ้นเมื่อความรุนแรงของสิ่งกระตุ้นมากขึ้น (Ito et al 1981, Price et al 1986, Yokota and Nishikawa 1980) เซลล์ WDR พบอยู่ในชั้นลึก (lamina IV หรือ V) ของกลุ่มเซลล์ Vc เซลล์ประสาท nociceptive ในกลุ่มเซลล์ Vc แต่ละเซลล์มีการรับสัมผัสจากใยประสาทเป็นจำนวนมาก (convergence) ส่งผลให้แต่ละเซลล์มี receptive field ที่มีขนาดใหญ่ ลักษณะการเรียงตัวดังกล่าวทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการปวดศีรษะมักไม่สามารถกำหนดตำแหน่งที่ปวดได้ชัดเจน (poor spatial discrimination) และบางครั้งอาจมีอาการปวดที่กระจายออกไปยังบริเวณที่ไกลจากตำแหน่งที่มีพยาธิสภาพได้

เนื่องจากหลอดเลือดเป็นอวัยวะภายในโพรงกะโหลกศีรษะที่ไวต่อการปวด และมีความสำคัญมากที่สุดในกระบวนการเกิดอาการปวดในกลุ่มอาการปวดศีรษะ ดังนั้นการทำงานของเซลล์ประสาท Vc ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้น nociception ที่หลอดเลือดจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ (Davis and Dostrovsky 1984, Strassman et al 1986, Burnett et al 1998) เซลล์ประสาทที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นหลอดเลือดบริเวณเยื่อ dura (dura-responsive neuron) เหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ NS หรือ WDR และตอบสนองต่อการกระตุ้นบริเวณใบหน้าโดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบอกตาและบริเวณขมับ ลักษณะของ receptive field ดังกล่าวช่วยให้เกิดอาการปวดศีรษะที่พบในผู้ป่วยโรคปวดศีรษะไมเกรนที่มักมีอาการปวดบริเวณขมับและหลังกระบอกตา เซลล์เหล่านี้ตอบสนองต่อการกระตุ้น nociception ในหลายลักษณะ อาทิ แรงดึงรั้ง (Davis and Dostrovsky 1988), สารเคมีที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เช่น bradykinin เป็นต้น โดยตอบสนองทั้งที่เป็นการให้เฉพาะตำแหน่ง หรือการฉีดสารเคมีในช่อง subarachnoid space (Ebersberger et al 1997) ผลการศึกษาทางสรีรวิทยาของเซลล์เหล่านี้สอดคล้องกับการศึกษาโดยวิธีการย้อม Fos-like immunoreactivity (FLI) ซึ่งพบว่าเซลล์ใน lamina I และ V ของ Vc จะมี FLI เมื่อกระตุ้น

หลอดเลือดดำ superior sagittal sinus ด้วยไฟฟ้าหรือแรงกล (Kaube et al 1992, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่ายาที่ใช้ในการระงับอาการปวดศีรษะในผู้ป่วยไมเกรน เช่น จากกลุ่ม ergot alkaloid หรือ serotonin agonist เช่นยากลุ่ม triptan เป็นต้นสามารถลดจำนวน FLI cell ลงและลดอัตราส่งกระแสประสาทของเซลล์ Vc เหล่านี้ (Nozaki et al 1992b, Goadsby and Hoskin 1996) ทั้งนี้รวมไปถึงการศึกษาที่ใช้วิธีการฉีดยา (iontophoretic injection) เข้าในตำแหน่งกลุ่มเซลล์ Vc โดยตรง ซึ่งให้ผลขับยั้งเซลล์ดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน (Lambert et al 1992). ผลการศึกษาเหล่านี้บ่งถึงบทบาทของเซลล์ Vc และการเกิดอาการปวดศีรษะในผู้ป่วยไมเกรน การศึกษาโดยวิธี intracellular labeling ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ศึกษาลักษณะของการแตกแขนง (arborization) ของ axon และ dendrite พบว่าเซลล์ dura-responsive neuron ใน lamina I และ V ของกลุ่มเซลล์ Vc มีการแตกแขนงของ axon ออกอย่างกว้างขวางและมีการติดต่อกันภายในกลุ่มเซลล์ Vc รวมไปถึงส่วนท้ายของกลุ่มเซลล์ Vi (Strassman et al 1994) การแผ่ขยายสาขาของแขนง axon เหล่านี้เป็นผลให้เมื่อศึกษาโดยใช้วิธี FLI จึงพบเซลล์ประสาทที่มี FLI กระจายเป็นบริเวณกว้างและทำให้อาการปวดศีรษะไมเกรนขอบเขตที่ชัดเจน

เช่นเดียวกับการทำงานของเซลล์ประสาท projection neuron ใน dorsal horn ของไขสันหลัง การทำงานของเซลล์ TNBC ถูกควบคุมอย่างใกล้ชิดโดยใยประสาทที่ผ่านมาจากสมองส่วนต่างๆ ซึ่งบริเวณที่มีความสำคัญประกอบด้วย periaqueductal gray (PAG), rostral ventromedial medulla (RVM) และ dorsolateral pontine tegmentum (DLPT) บริเวณเหล่านี้รับใยประสาทจากสมองระดับสูงขึ้นๆ เช่นที่ hypothalamus, amygdala, และ insular cortex เป็นต้น สำหรับวงจรภายในระดับของกลุ่มเซลล์ TNBC หรือ MDH ซึ่งทำหน้าที่ปรับแต่งการทำงานของเซลล์ HS และ WDR ในกลุ่มเซลล์ TNBC นั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามน่าจะมีระบบการทำงานดังกล่าวอยู่เช่นเดียวกับระบบใน dorsal horn ของระดับไขสันหลัง ลักษณะจำเพาะที่มีความสำคัญเกี่ยวกับระบบควบคุมการทำงานของเซลล์บริเวณนี้ คือ บนผนังของเซลล์ประสาทใน Vc และใยประสาท nociceptive C-fiber ที่มายังเซลล์เหล่านี้มีตัวรับ 5-HT$_{1B/1D}$ serotonin receptor ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการส่งกระแสประสาทของเซลล์ Vc ลดลงและปริมาณของสารสื่อประสาทที่ถูกปลดปล่อยออกจากใยประสาท nociceptive C-fiber (Longmore et al 1997) ซึ่งตัวรับนี้เป็นตำแหน่งออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม triptan

PROJECTIONS FROM TNBC

เส้นทางติดต่อระหว่างกลุ่มเซลล์ TNBC และ thalamus (Connection between TNBC and Thalamus)

เซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ TNBC จะให้ใยประสาทขึ้นแนวกึ่งกลาง และทอดขึ้นบนไปสิ้นสุดยังตำแหน่งต่างๆของสมอง เส้นทางสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกตำแหน่งของการรับความรู้สึกเส้นทางที่ไปสิ้นสุดที่ thalamus ใยประสาทที่มาจากกลุ่มเซลล์ Vp จะทอดขึ้นแนวกึ่งกลางและผ่านขนานไปกับวิถีประสาท medial lemniscus จึงอาจเรียกเส้นทางนี้ว่า trigeminal medial lemniscus ส่วนใยประสาทที่มาจากส่วนต่างๆของกลุ่มเซลล์ Vsp จะทอดขึ้นแนวกึ่งกลางและทอดขึ้นบนขนานไปกับวิถีประสาท spinothalamic tract ใยประสาท trigeminothalamic เหล่านี้จะสิ้นสุดโดยส่วนใหญ่สัมผัสกับเซลล์ในส่วนใน (medial portion) กลุ่มเซลล์ ventroposterior complex (VPM) ของ thalamus (หรือกลุ่มเซลล์ ventrobasal complex ในสัตว์ตระกูล rodent)

เซลล์ประสาทส่วนใหญ่ของกลุ่มเซลล์ VPM มีลักษณะการตอบสนองที่ไวต่อการกระตุ้นที่มีความแรงต่ำ (low-threshold) (Lenz et al 1983) ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญในการส่งกระแสประสาทที่เกี่ยวข้องกับความรู้สึกสัมผัส สำหรับเซลล์ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นที่เป็นอันตราย หรือ nociceptive cell นั้น จากการศึกษาในแมวพบว่าเซลล์ดังกล่าวรวมตัวอยู่ในส่วนเปลือกนอก (shell) ของกลุ่มเซลล์ VPM ส่วนการศึกษาในสัตว์

ตระกูลวานรพบว่าเซลล์ nociceptive (ซึ่งมีจำนวนประมาณร้อยละ 10 ของเซลล์ทั้งหมด) จะกระจายอยู่ทั่วไปในกลุ่มเซลล์ VPM (Guilbaud et al 1994, Yokota et al 1985) รูปแบบการตอบสนองของเซลล์ใน VPM มีทั้งที่จำเพาะต่อการกระตุ้นที่รุนแรง (NS cell) และที่มีลักษณะการตอบสนองแบบ WDR neuron ซึ่งจะตอบสนองต่อการกระตุ้นที่เป็น low-threshold และการตอบสนองจะรุนแรงขึ้นเมื่อมีถูกกระตุ้นด้วย high-threshold stimulation ลักษณะของ graded response ดังกล่าวรวมถึงการที่เซลล์ใน VPM มีตำแหน่งและขนาดของ receptive field ที่ชัดเจน ตลอดจนการเรียงตัวที่เป็น somatotopy บ่งชี้ว่าหน้าที่สำคัญของเซลล์เหล่านี้คือการกำหนดตำแหน่งของความรู้สึกปวด (Craig and Dostrovsky 1997, Willis 1997)

Yokota และคณะได้ทำการศึกษาโดยการทำงานของเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้น nociception พบว่าการทำงานของเซลล์ nociceptive VPM neuron จะลดลง เมื่อยับยั้งการทำงานของเซลล์ส่วนปลายของกลุ่มเซลล์ TNBC หรือเมื่อวิถีประสาท spinal trigeminal tract ถูกตัด ซึ่งประชี้ว่าเซลล์ดังกล่าวรับใยประสาท nociceptive ที่มาจากส่วนปลายของกลุ่มเซลล์ TNBC (Yokota et al 1983) การศึกษาในแมวพบว่าเซลล์ในส่วนเปลือกนอกของ VPM และส่วนกลางของ posterior complex (POm) ของ thalamus สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นที่หลอดเลือดบริเวณเยื่อ dura (Davis and Dostrovsky 1988, Zagami and Lambert 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ในกลุ่มเซลล์ VPM และ POm มีอัตราการใช้พลังงานสูงขึ้นเมื่อถูกหลอดเลือดดำ superior sagittal sinus ถูกกระตุ้น (Goadsby et al 1991) การศึกษาเหล่านี้ยืนยันถึงบทบาทของกลุ่มเซลล์ VPM และ POm ในกระบวนการเกิดความรู้สึกปวดจากโครงสร้างต่างๆบริเวณศีรษะ

นอกจากนี้จาก VPM แล้ว ใยประสาทจาก TNBC ยังไปสิ้นสุดยังกลุ่มเซลล์อื่นๆของ thalamus บริเวณที่มีความสำคัญ ได้แก่ medial thalamus โดยเฉพาะกลุ่มเซลล์ submedius (Craig and Burton 1981) กลุ่มเซลล์ใน medial thalamus อาทิ กลุ่มเซลล์ centralis lateralis, centre median, parafascicular nucleus และ submedius รับใยประสาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดความรู้สึกปวดผ่านทางวิถีประสาท spinothalamic และ trigeminothalamic tract หรือผ่านทางกลุ่มเซลล์ reticular formation ในก้านสมอง (Craig and Dostrovsky 1997, Willis 1997) กลุ่มเซลล์นี้มีลักษณะทางกายวิภาคที่ต่างจากกลุ่มเซลล์ใน lateral thalamus กล่าวคือไม่มีแบบแผนของ somatotopy ที่ชัดเจน แต่มีรับใยประสาทจากสมองส่วนต่างๆและส่งใยประสาทกระจายออกไปสิ้นสุดยังส่วนอื่นๆเป็นบริเวณกว้าง ลักษณะการเรียงตัวเช่นนี้บ่งชี้ว่ากลุ่มเซลล์ใน medial thalamus มิได้มีบทบาทในการกำหนดตำแหน่งของบริเวณที่เกิดความรู้สึกปวด แต่อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการตอบสนองทางอารมณ์และการตื่นตัว (affective and motivation) (Sessle 1987)

Projections from TNBC to other subcortical nuclei

เช่นเดียวกับรูปแบบการส่งใยประสาทจากเซลล์ใน dorsal horn ของไขสันหลัง เซลล์ในกลุ่มเซลล์ TNBC ยังให้ใยประสาทไปสิ้นสุดในบริเวณอื่นๆนอกเหนือ thalamus เส้นทางเหล่านี้มักทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองทางอารมณ์และพฤติกรรม ตลอดจนปรับเปลี่ยนความรุนแรงของความรู้สึกปวดมากกว่าทำหน้าที่กำหนดตำแหน่ง ทั้งนี้เนื่องจากการเรียงของใยประสาทที่ไม่มี somatotopy ตัวอย่างของเส้นทางเหล่านี้ ได้แก่ วิถีประสาท trigeminohypothalamic tract ซึ่งใยประสาทไปสิ้นสุดยังกลุ่มเซลล์ lateral preoptic, anterior, lateral, perifornical และ caudal nuclei ของ hypothalamus (Malick and Burstein 1998) กลุ่มเซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองทางอารมณ์, ฮอร์โมน, ระบบประสาท autonomic และพฤติกรรม และอาจมีบทบาทในการเกิดการเปลี่ยนแปลงในพฤติกรรมต่างๆซึ่งพบในช่วง prodrome ของการเกิดไมเกรน

บริเวณ parabrachial area ของก้านสมองระดับ pons เป็นอีกบริเวณที่รับใยประสาท TNBC ซึ่งผ่านขึ้นไปทางก้านสมองทั้งสองด้านและสิ้นสุดยังกลุ่มเซลล์ parabracial และ Kolliker-Fuse ใยประสาทนี้เชื่อว่าเป็นส่วนหนึ่งของเส้นทาง trigemino-ponto-amygdaloid pathway (Bernard et al 1989) ซึ่งควบคุมการแสดงออกทางอารมณ์, พฤติกรรม และ autonomic ต่อการกระตุ้น nociception นอกจากรับใยประสาทจากกลุ่มเซลล์ TNBC แล้ว เซลล์ประสาทใน parabrachial area ยังให้ใยประสาทย้อนทางไปสิ้นสุดยัง TNBC และทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองของเซลล์ประสาทใน TNBC ด้วย

นอกจากบริเวณทั้งสองแล้ว การศึกษาโดยวิธี tract tracing พบว่าเซลล์ประสาทใน TNBC ยังให้ใยประสาทไปยังสมองส่วนอื่นๆอีกเป็นจำนวนมาก (Marfurt and Rajchert 1991) อาทิ บริเวณ superior colliculus (Bruce et al 1987), cerebellum ด้านเดียวกัน (Mantle St. John and Tracey 1987), inferior olive ด้านตรงข้าม (Jacquin et al 1989), nucleus of solitary tract (Marfurt and Rajchert 1991) และ reticular formation (Renehan et al 1986) การทำงานของส่วนต่างๆเหล่านี้ในกระบวนการเกิดอาการปวดศีรษะยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

สมองใหญ่และระบบ trigeminal

Kenshalo และคณะ (Kenshalo and Isensee 1983, Chudler et al 1990) ได้ทำการศึกษาการทำงานของบริเวณ postcentral gyrus ซึ่งทำหน้าที่เป็น primary sensory cortex (SI) ในกระบวนการรับการกระตุ้น nociception บริเวณศีรษะและการเกิดอาการปวดบริเวณศีรษะ และได้จำแนกกลุ่มเซลล์ประสาทที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีขอบเขตของบริเวณรับการกระตุ้น (receptive field) ที่ชัดเจน และจะตอบสนองต่อการกระตุ้นตัวรับ nociceptor ในตำแหน่งจำเพาะของด้านตรงข้าม อีกนัยหนึ่งการทำงานดังกล่าวบ่งชี้ว่าเซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการกำหนดตำแหน่งของความรู้สึกปวด ส่วนเซลล์กลุ่มที่สองไม่มีขอบเขตของบริเวณรับการกระตุ้นที่ชัดเจน แต่จะตอบสนองไม่ว่าการกระตุ้นนั้นจะเกิดขึ้นที่บริเวณใด (หรือเรียกได้ว่าเป็น whole-body receptive field) ซึ่งลักษณะดังกล่าวย่อมไม่สามารถใช้ในการระบุตำแหน่งของอาการปวดได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่าเซลล์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ในส่วนที่เกี่ยวกับการตื่นตัวของสมองใหญ่ (cortical arousal)

การศึกษาในระยะหลังโดยใช้ positron emission tomography (PET) พบว่า เมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดอาการปวดโดยฉีดสาร capsaicin เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหน้าผาก พบว่ามีการเพิ่มของปริมาณเลือดที่ไปยังสมองใหญ่ส่วน insula และ anterior cingulate cortex (May et al 1998) ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับที่พบการเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยไมเกรนขณะเกิดอาการ (Weiller et al 1995) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวน่าจะเป็นการตอบสนองชนิดไม่จำเพาะ (non-specific response) ต่อการกระตุ้น nociception เนื่องจากเป็นบริเวณที่พบการตอบสนองเมื่อมีการกระตุ้นตัวรับ nociceptor ในส่วนต่างๆของร่างกาย มิได้จำกัดเฉพาะบริเวณศีรษะ

ภาวะ Central sensitization ของเซลล์ประสาทใน Trigeminal Nociceptive System

เซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ TNBC สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบและความรุนแรงของการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหนึ่งๆ โดยทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของการทำงานของเซลล์ในขณะนั้น (activity-dependent plasticity) ความสามารถในการปรับเปลี่ยนและยืดหยุ่น (plasticity) นี้เป็นคุณลักษณะพื้นฐานในการทำงานของระบบประสาททั้งนี้เพื่อทำให้การตอบสนองมีความหลากหลายและเหมาะสมยิ่งขึ้น ในบางกรณีการเปลี่ยนรูปแบบการตอบสนองนี้อาจไม่พึงประสงค์อาจนำไปสู่ความผิดปรกติทางคลินิก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตอบสนองของ spinal nociceptive neuron ที่มากขึ้นหรือที่เรียกว่าภาวะ central sensitization ซึ่งปัจจุบันเชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในพยาธิ

กำเนิดของกลุ่มอาการปวดชนิดต่างๆรวมถึงกลุ่มอาการปวดศีรษะ (McMahon et al 1993, Woolf and Doubell 1994, Burstein and Woolf 2000)

กระบวนการ central sensitization เป็นการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ประสาทใน dorsal horn ของไขสันหลังหรือในกลุ่มเซลล์ TNBC ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยกระแสประสาทในใยประสาท C-fiber การเพิ่มของการทำงานนี้เป็นลักษณะพิเศษของระบบ nociception และไม่พบเมื่อมีการกระตุ้นใยประสาท A-fiber ซึ่งเป็น low-threshold และทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบสัมผัส (Woolf and Wall 1986) กระบวนการเกิด central sensitization สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 ระยะ คือ ระยะก่อตัว (initiation phase) และ ระยะคงตัว (maintenance phase) (Burstein and Woolf 2000) กลไกที่ทำให้เกิดระยะก่อตัวเริ่มต้นจากการกระตุ้นใยประสาท C-fiber ซึ่งทำให้เกิดการปลดปล่อยสารสื่อประสาทและเปปไทด์ออกจาก central axon ของใยประสาท trigeminal กระบวนการปลดปล่อยสารสื่อประสาทเหล่านี้ถูกควบคุมทั้งจาก interneuron ในระดับนั้น และจากใยประสาทที่มาจากส่วนอื่นๆของระบบประสาท โดยผ่านการทำงานของสารสื่อประสาทหลายชนิด ซึ่งสารที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องเป็นพิเศษในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะในภาวะไมเกรน คือ serotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT) ทั้งนี้พบว่าตัวรับ 5-HT_{1B} serotonin receptor เป็นตัวรับที่พบทั้ง peripheral axon ของใยประสาท trigeminal ที่ไปยังหลอดเลือดในเยื่อ dura และ central axon ที่ไปสิ้นสุดยังเซลล์ประสาทใน TNBC ซึ่งยาที่ออกฤทธิ์กระตุ้นตัวรับดังกล่าว อาทิ ยาในตระกูล triptans และ ergot alkaloid มีผลในการยับยั้งการส่งกระแสประสาทของเซลล์ TNBC รวมทั้งผลต่ออาการปวดศีรษะในผู้ป่วย (Goadsby and Hoskin 1996)

ใยประสาท C-fiber ที่มาสิ้นสุดยังกลุ่มเซลล์ Vc จะปลดปล่อยสารสื่อประสาทและ peptide หลายชนิด อาทิ glutamate, adenosine triphosphate (ATP), CGRP, SP และ brain-derive nerve growth factor (BDNF) สารเหล่านี้จะกระตุ้นให้หน่วยของเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ TNBC โดยเฉพาะบริเวณกลุ่มเซลล์ Vc ให้เกิด depolarization ด้วยกลไกที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้ศักย์ไฟฟ้าของตัวรับที่เกิดขึ้น (postsynaptic excitatory potential: EPSP) มีระยะเวลาต่างกัน (ดูรายละเอียดในบทที่ 2) ลักษณะจำเพาะของระบบ nociception ที่แตกต่างจากระบบการรับความรู้สึกสัมผัส คือ ศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่เซลล์ประสาท spinal nociceptive มีระยะเวลาที่ยาว (slow response) ซึ่งระยะเวลาการตอบสนองที่ยาวดังกล่าวทำให้เอื้อต่อการเกิด synaptic summation ซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มในอัตราการส่งกระแสประสาทของเซลล์ Vc ได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า wind-up mechanism

เมื่อเซลล์ spinal nociceptive neuron ถูกกระตุ้นโดยใยประสาท nociceptive C-fiber จะเป็นผลให้ระดับ calcium ion ภายใน cytoplasm สูงขึ้น ทั้งจากการแพร่ผ่าน calcium channel ที่ผนังเซลล์, ผ่านกระบวนการกระตุ้นตัวรับ NMDA ของสาร glutamate หรือการแพร่ออกจากโครงสร้างภายในเซลล์เอง เช่น endoplasmic reticulum โดยผ่านการทำงานของ G-protein coupled receptor ชนิดต่างๆ ปริมาณ calcium ion ที่สูงขึ้นภายใน cytoplasm จะกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase C ซึ่งทำหน้าที่ phosphorylate โปรตีนชนิดต่างๆภายในเซลล์ รวมไปถึงโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของตัวรับ NMDA receptor เมื่อตัวรับดังกล่าวถูก phosphorylate จะทำให้การยับยั้งโดย magnesium ion ที่ช่องทางของ channel pore ลดลงเป็นผลให้ตัวรับนี้ถูกกระตุ้นโดยสาร glutamate ได้ง่ายขึ้น ไม่จำเป็นต้องอยู่ในภาวะที่ผนังเซลล์เป็น depolarization ดังในภาวะปรกติ(Chen et al 1992) นอกจากนี้ calcium ion ที่สูงขึ้นยังไปกระตุ้นเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งทำหน้าที่สร้าง nitric oxide (NO) อนุมูลอิสระ NO ที่สร้างขึ้นจะแพร่กลับไปยังใยประสาท presynaptic nociceptive C-fiber และกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยสารสื่อประสาทมากขึ้น และทำให้ synapse นั้นคงอยู่นานขึ้น การเปลี่ยนแปลงในลักษณะของ synapse (synaptic

plasticity) นี้เป็นกลไกที่คล้ายกับกระบวนการ long-term potentiation ที่เกิดขึ้นที่ hippocampus นอกเหนือจากการเพิ่มของการกระตุ้นจากใยประสาท nociceptive C-fiber ภาวะ central sensitization อีกอาจเป็นผลจากการทำงานลดลงของใยประสาทที่ทำหน้าที่ยับยั้ง (inhibitory fiber) เซลล์ในกลุ่มเซลล์ TNBC

เมื่อเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่ผ่านกระแสประสาทที่เกิดจากการกระตุ้นระบบ nociception เช่น spinal dorsal horn, TNBC หรือ thalamus อยู่ในภาวะ sensitization จะทำให้การทำงานเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาประกอบด้วย (1) การเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองของเซลล์ (cellular manifestation) ในภาวะนี้หนึ่งเซลล์จะมีค่า threshold ต่อการกระตุ้นลดลง (Cook et al 1987, Woolf et al 1990) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะทำให้ เซลล์ตอบสนองต่อ suprathreshold stimulus ด้วยขนาดที่มากขึ้น (increase stimulus-response gain) และสามารถตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่เป็น subthreshold stimulus ได้ ตัวอย่าง ได้แก่ การตอบสนองของเซลล์ประสาท NS หรือ WDR ใน TNBC ต่อการกระตุ้นบริเวณใบหน้าด้วยแรงกล หลังจากกระตุ้นให้เกิด central sensitization โดยกระตุ้นให้เยื่อหุ้มสมอง dura เกิดการอักเสบ (Burstein et al 1998) เป็นต้น รวมถึงอาจเกิดการส่งกระแสประสาทโดยปราศจากการกระตุ้นจากภายนอก (spontaneous activity), (2) การเปลี่ยนแปลงในขนาดของบริเวณรับการกระตุ้น (receptive field manifestation) เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะ central sensitization ขนาดของบริเวณรับการกระตุ้นของเซลล์นั้นจะขยายออก (receptive field expansion) ทำให้มีบริเวณที่สามารถกระตุ้นให้เกิดความรู้สึกปวดมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์ดังกล่าวอาจเป็นกลไกสำคัญในพยาธิกำเนิดของอาการและอาการแสดงบางประการที่พบในผู้ป่วยไมเกรน อาทิ การเกิดอาการปวดศีรษะที่มีจังหวะตามชีพจรน่าจะเป็นผลจากการที่เซลล์ใน TNBC ตอบสนองต่อ low-threshold mechanical stimulation หรืออาการเจ็บตามหนังศีรษะ น่าจะเป็นผลจากการขยายตัวของบริเวณรับการกระตุ้นเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะ central sensitization

วงจรประสาทไทรเจมินัลในวาสดูลาร์และพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะ

นอกจากเป็นเส้นทางในการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดที่เกิดขึ้นจากหลอดเลือดสมองบริเวณศีรษะ เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางแล้ว ระบบ trigeminal ยังมีอิทธิพลต่อความตึงตัว (tone) และขนาดของหลอดเลือด การศึกษาโดยการกระตุ้นปมประสาท trigeminal หรือแขนงของเส้นประสาทดังกล่าว สามารถทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดสมอง ตลอดจนการเพิ่มของปริมาณเลือดที่ไหลเวียนในบริเวณที่เลี้ยงด้วยเส้นประสาทนั้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้เชื่อว่า เป็นผลทั้งจากอิทธิพลของเส้นประสาท trigeminal ต่อหลอดเลือดโดยตรงและเป็นผลจากการกระตุ้นระบบประสาทอัตโนมัติ (โดยเฉพาะระบบประสาท parasympathetic) ที่ไปยังหลอดเลือดนั้นโดยผ่านวงจรประสาทในก้านสมอง อิทธิพลโดยตรงของเส้นประสาท trigeminal ต่อหลอดเลือดเกิดขึ้นโดยขณะที่มีการกระตุ้นเส้นประสาท trigeminal มีกระแสประสาทบางส่วนวิ่งย้อนทาง (antidromic) กลับไปถึงปลายประสาท และกระตุ้นให้ปลายประสาทนั้นหลั่งสารเคมีที่มีผลต่อหลอดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่ม peptide เช่น SP หรือ CGRP เป็นผลให้เกิดการขยายตัวและการอักเสบของหลอดเลือดนั้น

จากผลการศึกษาในปัจจุบัน แสดงให้เห็นว่ามีใยประสาทจากกลุ่มเซลล์ trigeminal ไปสิ้นสุดในกลุ่มเซลล์ในระบบประสาท autonomic บริเวณก้านสมอง โดยเฉพาะระบบประสาท parasympathetic ซึ่งจะให้ใยประสาท preganglionic parasympathetic fiber ผ่านไปกับเส้นประสาท facial และแยกไปตามแขนงประสาท greater superficial petrosal nerve (GSPN) ไปสิ้นสุดโดยซินแอปส์กับเซลล์ในปมประสาท sphenopalatine ซึ่งจะให้ใยประสาท postganglionic เรียงตัวเป็นร่างแหประสาทพันไปตามหลอดเลือดแดงในกะโหลกศีรษะจนถึง

ระดับของหลอดเลือดแดงในเยื่อหุ้มสมองชั้นเพีย (pia artery) วงจรประสาทระหว่างเส้นประสาท trigeminal และระบบประสาท parasympathetic ได้รับการยืนยันจากการศึกษาในระยะหลังโดย Hara และคณะ (1993) ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้สาร wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase (WGA-HRP) ฉีดลงในบริเวณปมประสาท sphenopalatine ซึ่งสารนี้จะถูกนำไปตามใยประสาท ผลการศึกษาพบว่ามีสารดังกล่าวในเซลล์ของปมประสาท gasserian ด้วย แสดงว่ามีการสื่อสารระหว่างเซลล์ในระบบประสาทพาราซิมพาเธติกและระบบ trigeminal จริง เนื่องจากระบบประสาท parasympathetic ทำหน้าที่ขยายหลอดเลือดในโพรงกะโหลกศีรษะ ดังนั้นเมื่อมีการกระตุ้นเส้นประสาท trigeminal กระแสประสาทบางส่วนจะถูกนำเข้าสู่ก้านสมอง (orthodromic) และกระตุ้นเซลล์ประสาท autonomic เป็นผลให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดโดยผ่านวงจรปฏิกิริยาตอบสนองดังกล่าว เรียกปฏิกิริยาตอบสนองที่ผ่านวงจรประสาทในก้านสมองนี้ว่า trigeminovascular reflex ซึ่งในปัจจุบันเชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน

สมมุติฐานดังกล่าวมีรากฐานมาจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นเส้นประสาท trigeminal ด้วยไฟฟ้า จะเป็นผลให้เกิดการรั่วของโปรตีนออกมาจากหลอดเลือด (plasma protein extravasation: PPE) ในบริเวณเยื่อ dura ที่เลี้ยงด้วยเส้นประสาทนั้น (Markowitz et al, 1987) การรั่วของสารโปรตีนนี้จะไม่เกิดขึ้นหากให้ capsaicin ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ SP หมดไปจากปลายประสาทในระยะที่สัตว์ทดลองยังเป็นตัวอ่อน ในทางตรงกันข้ามหากกระตุ้นเส้นประสาทด้วย SP หรือ NKA จะทำให้เกิดการรั่วนี้เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Hardebo, 1991) จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับจุลกายวิภาคโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า ภายหลังจากการกระตุ้นปมประสาทแกสเซียนด้วยไฟฟ้าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อหลอดเลือดและเซลล์อื่นๆ เช่น เกร็ดเลือด, mast cell กล่าวคือเซลล์เยื่อบุโลหิตเล็ก (endothelial cell) จะมีขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophy), มีการสร้าง vesicle และ vacuole ขึ้นภายในเซลล์และมี microvilli เกิดขึ้นที่ผิวเซลล์, มีการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ของเกร็ดเลือดและบางส่วนจะมาเกาะติด (adhesion) กับเซลล์เยื่อบุโลหิตเล็ก, mast cell จะมีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างที่บ่งชี้ว่าเกิดการหลั่ง (secretion) และ degranulation เช่นการสลาย (disintegration) ของผิวเซลล์ และการสูญเสียสารทึบอิเล็กตรอน (electron dense material) ซึ่งปรากฏพบในแกรนูลของ cytoplasm การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างเหล่านี้จะเกิดขึ้นเฉพาะเมื่อมีใยประสาทขนาดเล็กรอบหลอดเลือดอยู่เท่านั้น และจะไม่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองที่ได้รับ capsaicin (Dimitriadou et al, 1991)

แม้ว่าจากหลักฐานทั้งหมดข้างต้น จะบ่งชี้ว่าการเกิดการอักเสบปลอดเชื้อรอบหลอดเลือด (perivascular sterile inflammation) ซึ่งที่เป็นผลจากการกระตุ้นเส้นประสาท trigeminal (โดยสิ่งกระตุ้นที่ยังไม่ทราบแน่ชัด) ทำให้เกิดการหลั่งสารต่างๆที่บริเวณปลายประสาท และการกระตุ้นวงจรประสาท trigeminovascular ทำให้เกิดการหลั่งสาร VIP จากปลายประสาท parasympathetic น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดอาการปวดศีรษะในผู้ป่วยไมเกรน อย่างไรก็ตามการศึกษาในระยะหลังพบว่าสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด sterile inflammation และ PPE เช่น CP122,288 ไม่สามารถลดการตอบสนองของเซลล์ประสาทใน TNSC ในสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นที่ superior sagittal sinus (Goadsby and Hoskin 1999) นอกจากนี้ยาดังกล่าวยังไม่สามารถลดอาการปวดศีรษะในผู้ป่วยไมเกรน (Ruoff et al 2000) ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงว่า sterile inflammation และ PPE ที่เกิดขึ้นเมื่อหลอดเลือดถูกกระตุ้นนั้น อาจไม่ใช่ตัวการสำคัญในการเกิดอาการปวดศีรษะ

หลอดเลือดสมอง: ลักษณะของกายวิภาคและสรีรวิทยาของเซลล์เยื่อบุโลหิตเล็ก

อวัยวะในระบบประสาทส่วนกลาง คือ สมองและไขสันหลัง เป็นอวัยวะที่มีความสำคัญยิ่งในการทำงานของร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงได้พัฒนากลไกต่างๆเพื่อช่วยรักษาอวัยวะเหล่านี้ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสมองและไขสันหลังต้องการเลือดไปเลี้ยงเป็นอัตราที่สูงกว่าอวัยวะอื่น และการขาดเลือดเป็นช่วงเวลาอันสั้นอาจเป็นผลให้เซลล์ประสาทถูกทำลายอย่างถาวรได้ ร่างกายจึงพัฒนาให้สมองมีระบบไหลเวียนเลือดซึ่งมีลักษณะพิเศษที่สามารถปรับอัตราการไหลของเลือด (cerebral blood flow) ให้มีค่าค่อนข้างคงที่ ไม่ขึ้นลงตามความดันเลือดของร่างกาย และมีอัตราการไหลเฉพาะที่ (regional cerebral blood flow) แปรไปตามการทำงานของเซลล์ประสาทในบริเวณนั้นๆ นอกเหนือจากลักษณะดังกล่าว หลอดเลือดในสมองส่วนใหญ่ยังมีคุณสมบัติที่ไม่ยอมให้มีการซึมผ่านของสารต่างๆได้โดยง่าย ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการควบคุมให้ลักษณะของของเหลวนอกเซลล์ (extracellular fluid) เช่น ความเข้มข้นของอิออนต่างๆ มีค่าคงที่ ไม่แปรเปลี่ยนไปตามการเปลี่ยนแปลงของระดับในเลือด คุณสมบัติดังกล่าวเป็นที่มาของแนวคิดเรื่อง blood-brain barrier จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้สามารถสรุปได้ว่า โครงสร้างที่ทำหน้าที่เป็น blood-brain barrier คือ เซลล์เยื่อบุโพรงเลือดของหลอดเลือดสมอง

เซลล์เยื่อบุโพรงเป็นโครงสร้างที่เป็นขอบเขตกั้นระหว่างเลือดและเนื้อเยื่อสมอง เซลล์นี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ อาทิเช่น ควบคุมอัตราการไหลของเลือด, ควบคุมปริมาณของสารในเลือดและเนื้อเยื่อสมอง, ควบคุมการขนส่งสารหรือเซลล์หรือเซลล์ชนิดต่างๆระหว่างเลือดและเนื้อสมอง ตลอดจนควบคุมการเจริญและการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือด ความผิดปรกติในการทำงานของเซลล์เยื่อบุโพรงเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของภาวะหรือโรคทางประสาทวิทยาจำนวนมาก

ลักษณะของเซลล์เยื่อบุโพรงในหลอดเลือดสมอง

เซลล์เยื่อบุโพรงของหลอดเลือดฝอยในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ blood-brain barrier มีลักษณะทางโครงสร้างและการทำงานที่ต่างไปจากเซลล์เยื่อบุโพรงหลอดเลือดฝอยในอวัยวะอื่นๆ (Crone 1986, Davson et al 1987, Goldstein and Betz 1986, Goldstein and Betz 1992, Fishman 1992, Betz et al 1994, Schilling and Wahl 1997) ความแตกต่างที่สำคัญ ได้แก่

1. มีโครงสร้างบริเวณรอยต่อของเซลล์เป็น tight junction (zonulae occludens) จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่า เซลล์เยื่อบุโพรงหลอดเลือดฝอยสมองเรียงชิดกัน โดยไม่มีรอยต่อระหว่างเซลล์ ในขณะที่หลอดเลือดอื่นมีช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุโพรงที่เรียกว่า gap junction จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวทำให้สารที่มีขนาดอณูใหญ่ไม่สามารถแทรกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ออกไปได้

2. มีกระบวนการนำสารผ่านเซลล์โดยวิธี pinocytosis น้อย จากการศึกษาของ Duc และคณะซึ่งศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดสมองในหนูพบว่าเซลล์เยื่อบุโพรงของหลอดเลือดสมองมี pinocytic vesicle เพียง 4 อุงการองในไครเมตร (Duc and Joo 1982)

3. เซลล์เยื่อบุโพรงของหลอดเลือดสมอง มีจำนวนไมโตคอนเดรียสูงกว่าเซลล์เยื่อบุโพรงของหลอดเลือดอื่น ไมโตคอนดริยาคิดเป็นร้อยละ 10 ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมด การที่มีไมโตคอนเดรียจำนวนมากนี้เป็นเครื่องบ่งชี้ว่า เซลล์เยื่อบุโพรงของหลอดเลือดสมองมีการทำงานที่ต้องอาศัยพลังงานมากกว่าเซลล์เยื่อบุโพรงของหลอดเลือดอื่น

4. มีระบบพิเศษเพื่อใช้ขนส่งสารผ่านผนังเซลล์ (facilitated transport system) เนื่องจากในภาวะปรกติเซลล์เยื่อบุโพรงยอมให้สารที่คุณสมบัติเป็น hydrophilic ผ่านผนังเซลล์ได้น้อยมาก ดังนั้นเซลล์เยื่อบุโพรงจึง

มีการพัฒนาระบบเพื่อใช้ขนส่งสารละลายบางชนิดขึ้นเป็นพิเศษ ลักษณะที่สำคัญของระบบขนส่งนี้คือ มีความจำเพาะสำหรับสารแต่ละชนิด รวมไปถึง stereospecificity, มีจุดอิ่มตัว (saturation kinetics), และมี competitive interaction ระหว่างสารที่มีลักษณะคล้ายกัน สารที่ถูกขนส่งโดยอาศัยกระบวนการนี้ได้แก่ กลูโคส, กรดอมิโน, และไอสิน เป็นต้น

5. มีอัตราการทำงานของเอนไซม์บางชนิดสูงกว่าเซลล์เอนโดธีเลียมทั่วไป เอนไซม์ดังกล่าว ได้แก่ ecto-nucleotidase, alkaline phosphatase, □-GTP, γ-glycoprotein และ Na-K-ATPase โดยเฉพาะเอนไซม์ Na-K-ATPase นั้นมีอัตราการทำงานสูงกว่าเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดลายสะดือถึง 500 เท่า (Eisenberg and Suddith 1979)

6. มีค่าศักย์ไฟฟ้าและความต้านทานระหว่างเซลล์เอนโดธีเลียมและเนื้อสมอง (transendothelial potential and resistance) สูง จากการศึกษาในหนูพบว่าค่าความต่างของศักย์ไฟฟ้าภายในและภายนอกหลอดเลือดเท่ากับ 4 มิลลิโวลท์ โดยภายในมีค่าเป็นลบเมื่อเทียบกับภายนอก (Rivera et al. 1994) ปรากฏการณ์ดังกล่าวเป็นผลจากการที่ผนังด้านในของเซลล์เอนโดธีเลียมถูกเคลือบด้วย glycocalyx ซึ่งมีกลุ่มที่มีประจุลบเช่นกลุ่มไซลาลิล (sialyl), อะมีน (amine) และคาร์บอกซิล (carboxyl) ของโปรตีนและฟอสโฟลิปิด ลักษณะดังกล่าวทำให้อัลบูมินที่มีประจุบวก (cationic albumin) เคลื่อนที่เข้าหลอดเลือดได้ดีกว่าอัลบูมินที่ประจุเป็นกลางนอกจากนี้ค่าความต้านทานข้ามเซลล์เอนโดธีเลียม (transendothelial resistance) ของหลอดเลือดสมองจึงมีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับหลอดเลือดบริเวณอื่น กล่าวคือมีค่าระหว่าง 1500-2000 โอห์ม/ตารางเซนติเมตร (Crone and Olesen 1984) ค่าดังกล่าวสูงกว่าในหลอดเลือดอื่นๆถึงกว่าร้อยเท่า

7. มีค่า reflection coefficient สูงและค่า hydraulic conductivity ต่ำ ด้วยค่าเช่นนี้ค่า reflection coefficient สำหรับรูโหว่สูงกว่าหลอดเลือดอื่นๆประมาณ 10 เท่า

นอกจากลักษณะพิเศษของเซลล์เอนโดธีเลียมแล้ว หลอดเลือดฝอยในสมองยังมีโครงสร้างที่ต่างจากหลอดเลือดฝอยในบริเวณอื่นของร่างกาย โดยเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดนี้เรียงชิดกันบนเยื่อ basement membrane (basal lamina) ซึ่งประกอบขึ้นจาก collagen, โปรตีนอื่นๆ และ proteoglycan โครงสร้างนี้มีหน้าที่รองรับเซลล์เอนโดธีเลียม, เป็นแผ่นกรองชนิด semipermeable และเป็นโครงสำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ในระหว่างช่วงของการเจริญเติบโต เนื่องจากเยื่อ basement membrane มีความเหนียวต่อการฉีก (tensile strength) ดังนั้นจึงเชื่อว่าเยื่อนี้น่าจะมีบทบาทในการรักษารูปร่างของหลอดเลือดฝอย และป้องกันการแตกของหลอดเลือด เยื่อ basement membrane จะหนาขึ้นในบางพยาธิสภาพ เช่น โรคเบาหวาน ความดันเลือดสูง อายุมาก เป็นต้น

โครงสร้างที่อยู่ชิดกับเยื่อ basement membrane ทางด้านนอก (abluminal side) ของหลอดเลือดฝอย คือ เซลล์เพอริไซต์ (pericyte) เนื่องจากเซลล์มีด้านหนึ่งชิดกับเยื่อ basement membrane จึงเชื่อว่าน่าจะทำหน้าที่สร้างสารที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อ basement membrane, กักกิน (phagocytosis) การแปลกปลอมที่ผู้รอบหลอดเลือด, รักษาโครงสร้างของหลอดเลือดฝอย และควบคุมการเจริญของเซลล์เอนโดธีเลียม ทั้งนี้อาจรวมไปถึงบทบาทในการควบคุมอัตราการไหลของเลือดในหลอดเลือดฝอยด้วย

หลอดเลือดฝอยของสมองมีความสัมพันธ์กับเซลล์ประสาทเป็นอย่างใกล้ชิด กล่าวคือผนังด้านนอกของหลอดเลือดถูกหุ้มด้วยส่วน foot process ของเซลล์แอสโตรไซต์ (astrocyte) เนื่องจากเซลล์แอสโตรไซต์ให้แขนง

ไปยังเซลล์ประสาทและเซลล์อีเพนไดมา (ependymal cell) ที่อยู่รอบโพรงสมองด้วย ดังนั้นจึงเชื่อว่าเซลล์แอสโตรไซต์น่าจะมีหน้าที่ที่สัมพันธ์กับเซลล์ดังกล่าว เช่น แลกเปลี่ยนสารระหว่างเซลล์และควบคุมการทำงานของหลอดเลือดฝอย (Stewart 1997) การศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์นอกร่างกายพบว่าเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองจะมีการเรียงตัวหรือมีการสร้าง tight junction ซึ่งเป็นลักษณะของ blood-brain barrier รวมถึงมีความสามารถในการควบคุมการซึมผ่านของสารอณูใหญ่ เฉพาะเมื่อมีการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโตรไซต์ร่วมด้วยเท่านั้น (Wolburg et al 1994, Grabb and Gilbert 1995) ผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าเซลล์แอสโตรไซต์มีบทบาทสำคัญยิ่งในการหนี่ยวนำให้เซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองมีลักษณะของ blood-brain barrier อย่างไรก็ตามการศึกษาชนิด in vivo ซึ่งศึกษาผลของการขาดเซลล์แอสโตรไซต์ในสมองตัวอ่อนพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในการเจริญของ blood brain barrier อย่างมีนัยสำคัญ (Kraus 1996) การสูญเสียความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เอนโดธีเลียมและเซลล์แอสโตรไซต์จะทำให้หลอดเลือดสมองเสียคุณลักษณะของ blood-brain barrier ดังตัวอย่างที่พบในหลอดเลือดของเนื้องอกสมอง เป็นต้น

สรีรวิทยาของ Blood-Brain Barrier

Blood-brain barrier ยอมให้สารแต่ละชนิดผ่านได้ต่างกัน น้ำหนักอณู (molecular weight) เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการซึมผ่านของสารนั้นๆ สารที่มีอณูขนาดใหญ่จะผ่าน blood-brain barrier ได้จากตัวอย่างที่เห็นได้ชัด ได้แก่ โปรตีนอัลบูมินซึ่งมีน้ำหนักอณูเท่ากับ 69,000 daltons และผ่านผนังหลอดเลือดได้น้อย เป็นผลให้ปริมาณของอัลบูมินในน้ำไขสันหลังมีค่าต่ำกว่าในเลือดถึง 200 เท่า ขนาดของ hydrodynamic volume (Stokes-Einstein radius) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการซึมผ่าน นอกเหนือจากขนาดของสารนั้นๆแล้ว ยังมีลักษณะทางกายภาพอื่นๆที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน blood-brain barrier โดยทั่วไปสารที่จะผ่าน blood-brain barrier ได้ดีจะมีความสามารถในการละลายในไขมันสูง (high lipid solubility), มีการแตกตัวน้อยที่ความเป็นกรด-ด่างของร่างกาย (low ionization at physiologic pH) และไม่จับกับโปรตีนในพลาสมา ดังนั้นยาอนเช่น แคลเซียมหรือแมกนีเซียม ตลอดจนสารอื่น เช่น บิลิรูบิน หรือสารนิดด่างซึ่งจับกับโปรตีนจึงผ่านผนังหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อสมองได้น้อย ในขณะที่คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน ยาหรือฮอร์โมนในกลุ่มสเตอรอยด์ซึ่งละลายได้ดีในไขมันจะผ่าน blood-brain barrier ได้อย่างรวดเร็ว ข้อสังเกตที่น่าสนใจคือ ยาที่ละลายในไขมันและผ่าน blood-brain barrier ได้ดีมีความโน้มเอียงที่จะเกิดการติดยาได้ง่าย ยาเช่น heroin, nicotine, ethanol หรือ diazepam เป็นต้น

โครงสร้างของ blood-brain barrier จึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการควบคุมแรงดันออสโมติก (osmotic regulation) ตลอดจนการแลกเปลี่ยนน้ำและอิออนระหว่างหลอดเลือดและเนื้อสมอง ลักษณะสำคัญที่ทำให้ของเหลวภายในและภายนอกหลอดเลือดสมองมีความแตกต่างในแรงดันออสโมติก คือ การที่หลอดเลือดสมองยอมให้อณูของน้ำเคลื่อนที่ผ่านผนังได้โดยสะดวก จากการศึกษาโดยใช้อณูของน้ำที่ติดฉลากด้วยสารรังสีพบว่า อณูของน้ำสามารถผ่าน blood-brain barrier และปรากฏในเนื้อสมองถึงร้อยละ 93 ของปริมาณที่ฉีด และเข้าสู่ภาวะสมดุลอย่างรวดเร็ว เทียบเท่าอัตราการไหลของเลือด (Davson et al 1987) อณูของน้ำเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เอนโดธีเลียมโดยผ่านไปทางช่องบนผนังเซลล์ที่เรียกว่า aquaporin (Wintour 1997) ในขณะที่เซลล์เอนโดธีเลียมยอมให้น้ำผ่านได้โดยสะดวก แต่การเคลื่อนที่ผ่านของอิออนต่างๆกลับเป็นไปได้อย่างจำกัดและใช้เวลานานกว่าจะเข้าสู่ค่าสมดุล การที่เซลล์เอนโดธีเลียมของสมองยอมให้น้ำผ่านได้เกือบอิสระ ทำให้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของค่า osmolality ในพลาสมาจะทำให้ค่า osmolality ของเนื้อสมองและน้ำไขสันหลังเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย และ

เป็นกลไกสำคัญในการควบคุมความดันในโพรงกะโหลกศีรษะและปริมาตรของเนื้อสมอง ซึ่งความผิดปรกติของปริมาณน้ำในสมองจะเป็นผลให้เกิดภาวะสมองบวมแบบต่างๆ (Go 1997) ในทางวิชาปฏิบัติการให้สารที่มีค่าออสโมลิตสูงแต่ผ่าน blood-brain barrier ได้น้อย เช่น mannol จะเป็นผลให้มีการเคลื่อนที่ของอณูของน้ำกลับเข้าสู่หลอดเลือด และสามารถใช้ในการลดความดันภายในกะโหลกศีรษะได้

นอกเหนือจากคุณสมบัติทางกายภาพของสารแล้ว ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน blood-brain barrier คือ การมีระบบพิเศษเพื่อช่วยขนส่งสารนั้นที่ผนังเซลล์ จากการศึกษาเปรียบเทียบการซึมผ่านของสารที่ติดฉลากด้วยสารรังสีเทียบกับการซึมผ่านของน้ำ และคำนวณเป็นค่า brain uptake index ผลการศึกษาพบว่าสารบางชนิดสามารถผ่านเข้าสู่เนื้อสมองมากกว่าปรกติ เช่น น้ำตาลกลูโคสซึ่งมีน้ำหนักอณูใกล้เคียงกับ mannol แต่กลับมีค่า brain uptake index สูงกว่าถึง 20-30 เท่า การทำงานของระบบขนส่งสารที่ผนังเซลล์นี้ทำงานคล้ายเอนไซม์ กล่าวคืออัตราเร็วของการขนส่งขึ้นกับปริมาณและความสามารถในการเกาะจับ (affinity) ของสารนั้นต่อตำแหน่งจับ (binding site) บนตัวขนส่ง (transporter) ที่ผนังเซลล์ เนื่องจากตำแหน่งจับเหล่านี้สามารถจับกับสารที่มีโครงสร้างคล้ายกันมากกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกันจะแข่งที่จับบนตัวขนส่งชนิดเดียวกันได้ ตัวอย่างเช่นสารในกลุ่มกรดอมิโน เป็นต้น

ระบบการขนส่งกลูโคส (glucose transport system) เป็นระบบที่ได้รับการศึกษามากที่สุด ระบบนี้มีความคล้ายคลึงกับระบบขนส่งกลูโคสที่ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง การทำงานของระบบขนส่งกลูโคสมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของสมอง ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ประสาทใช้ได้มาจากการเผาผลาญกลูโคส โดยทั่วไประบบการขนส่งนี้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพและขนส่งกลูโคสได้ตามความต้องการของเซลล์ประสาท ยกเว้นในภาวะที่มีความผิดปรกติ เช่น การมีน้ำตาลในเลือดต่ำมาก (profound hypoglycemia) ซึ่งทำให้ปริมาณกลูโคสที่ถูกขนส่งสู่เนื้อสมองมีค่าต่ำกว่าความต้องการ หรือภาวะที่เซลล์สมองต้องการพลังงานมากกว่าปรกติ เช่น ภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) หรือภาวะชัก ซึ่งในภาวะดังกล่าว จำนวนของตัวขนส่งที่ผนังเซลล์เอนโดธีเลียมอาจมีจำนวนไม่เพียงพอที่จะขนส่งกลูโคสได้ตามความต้องการ จนก่อให้เกิดภาวะเซลล์สมองขาดกลูโคส แม้ว่าระดับกลูโคสในเลือดจะไม่ต่ำเท่าตัว ปริมาณของตัวขนส่งบนผนังเซลล์เอนโดธีเลียมอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานซึ่งมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงอยู่เป็นระยะเวลานาน เซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดฝอยในสมองจะมีการปรับตัวโดยลดจำนวนตัวขนส่งที่ผนังเซลล์ลง (down-regulation) ดังนั้นเมื่อมีการลดระดับกลูโคสในเลือดลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้การขนส่งกลูโคสเข้าสู่สมองลดลงจนเกิดภาวะเซลล์ประสาทขาดน้ำตาลได้ แม้ว่าระดับน้ำตาลในเลือดจะไม่ลดต่ำลงมากก็ตาม

นอกเหนือการกักกั้นสารที่มีอณูขนาดใหญ่แล้ว สารที่มีอณูขนาดเล็ก เช่น ไอออนต่างๆ ก็ถูกกักโดยเซลล์เอนโดธีเลียมที่เป็น blood-brain barrier ด้วย การควบคุมมิให้ไอออนต่างๆ เคลื่อนที่ผ่านเซลล์เอนโดธีเลียมได้โดยง่ายเป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้สมองและไขสันหลัง สามารถรักษาค่าความเข้มข้นของไอออนในการน้ำระหว่างเซลล์ (interstitial fluid) ไว้ได้ การรักษาค่าความเข้มข้นของไอออนให้คงที่มีความสำคัญยิ่งในการทำงานของสมอง ทั้งนี้เนื่องจากไอออนบางชนิด เช่น โปแตสเซียมมีผลในการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าของผนังเซลล์ และเมื่อปริมาณโปแตสเซียมภายนอกเซลล์สูงขึ้น จะทำให้ศักย์ไฟฟ้าของผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงจนอาจเกิด depolarization ได้ โครงสร้างของ blood-brain barrier จึงทำหน้าที่รักษาให้ค่าความเข้มข้นของโปแตสเซียมไอออนในสารน้ำระหว่างเซลล์มีค่าต่ำกว่าในเลือด กล่าวคือมีค่าประมาณ 2.8 มิลลิโมล ในขณะที่ในเลือดมีค่าระหว่าง 3-5 มิลลิโมล และการเปลี่ยนแปลงของระดับโปแตสเซียมอิออนในเลือดไม่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของโปแตส

เซียมอิออนในสมอง กลไกนี้เป็นผลจากการที่ผนังด้านในหลอดเลือด (luminal side) ของเซลล์เอนโดธีเลียมยอมให้โปแตสเซียมอิออนผ่านได้น้อยมาก ในขณะที่ผนังด้านนอกหลอดเลือดมีปั๊มพ์ (sodium-potassium ATPase pump) ซึ่งทำหน้าที่แลกโปแตสเซียมอิออนออกจากเนื้อสมองเข้าสู่เซลล์เอนโดธีเลียม (Goldstein 1979) กลไกนี้ทำงานร่วมกับเซลล์แอสโตรไซต์ในการควบคุมระดับโปแตสเซียมในสารน้ำนอกเซลล์ให้มีค่าต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะที่มีการทำงานของเซลล์ประสาท เนื่องจากการทำงานของปั๊มพ์ต้องอาศัยพลังงาน ดังนั้นภายในเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมอง จึงมีไมโตคอนดรียเป็นจำนวนมากกว่าเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดอื่นๆ ในส่วนของโซเดียมอิออนนั้น โซเดียมอิออนในเลือดสามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังเซลล์เอนโดธีเลียมได้อย่างค่อนข้างอิสระโดยผ่านตัวพาอย่างน้อย 2 ชนิดคือ ชนิดที่หนึ่งถูกยับยั้งด้วย amiloride และชนิดที่สองถูกยับยั้งด้วย furosemide (Betz 1983)

ถึงแม้ว่าหลอดเลือดส่วนใหญ่ในสมองจะมีโครงสร้างที่ทำหน้าที่เป็น blood-brain barrier แต่มีบางบริเวณที่หลอดเลือดมิได้มีลักษณะดังกล่าว ตำแหน่งเหล่านั้น ได้แก่ บริเวณ choroid plexus, ต่อมไพนีเยล (pineal gland), ต่อมใต้สมอง (pituitary gland) และโครงสร้างที่อยู่รอบโพรงสมอง (circumventricular organs) หลอดเลือดในบริเวณเหล่านี้มี fenestration และทำหน้าที่รับการเปลี่ยนแปลงของของเหลวนอกเซลล์ เพื่อปรับการทำงานของร่างกายให้อยู่ใน homeostasis (Ferguson and Baina 1996)

บทบาทของเซลล์เอนโดธีเลียมในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด

กระบวนการควบคุมการไหลของเลือดในสมอง (cerebral blood flow) และความตึงตัวของหลอดเลือดในสมองเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ทั้งนี้เนื่องจากสมองเป็นอวัยวะที่ต้องการเลือดเป็นปริมาณสูงกว่าอวัยวะอื่น คือประมาณ 50 มิลลิลิตร/100 กรัมของเนื้อสมองนาที ในภาวะปรกติอัตราการไหลของเลือดที่ไปยังสมองโดยรวมจะมีค่าค่อนข้างคงที่และไม่แปรไปตามการเปลี่ยนแปลงของความดันเลือด ซึ่งเรียกระบบการควบคุมนี้ว่า autoregulation (Chillon and Baumbach 1997) แม้ว่าอัตราการไหลโดยรวมจะมีค่าค่อนข้างคงที่แต่ปริมาณที่ไปยังสมองแต่ละบริเวณจะแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์ประสาทบริเวณนั้นๆ (metabolic regulation) (Magistretti 1997) นอกจากนี้หลอดเลือดในสมองยังตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสารน้ำนอกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับคาร์บอนไดออกไซด์ และ ออกซิเจนในสารน้ำนอกเซลล์ (chemical control) นอกจากนี้หลอดเลือดสมองยังตอบสนองต่อการกระตุ้นระบบประสาท (neurogenic control) ทั้งจากกลุ่มเซลล์ประสาทในบางบริเวณของสมองที่ให้ใยประสาทไปยังหลอดเลือด เช่น กลุ่มเซลล์ locus coeruleus หรือ nucleus raphe เป็นต้น ซึ่งเรียกว่า intrinsic innervation และจากเส้นประสาทที่เป็นระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) หรือเส้นประสาทรับความรู้สึก เช่นระบบ trigeminovascular เป็นต้น ซึ่งเรียกว่า extrinsic innervation (Goadsby and Edvinsson 1997)

เซลล์เอนโดธีเลียมมีบทบาทอย่างสูงในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular tone) หลอดเลือดสมองที่ขาดเซลล์เอนโดธีเลียมจะสูญเสียการทำงานในหลายลักษณะ เซลล์เอนโดธีเลียมควบคุมการหดหรือขยายตัวของหลอดเลือดโดยอาศัยการหลั่งสารเคมีชนิดต่างๆที่มีฤทธิ์ต่อหลอดเลือด (vasoactive substances) สารที่หลั่งจากเซลล์เอนโดธีเลียมและมีฤทธิ์ต่อหลอดเลือด (endothelial derived relaxing factors หรือ EDRFs) เช่น พรอสตาซัยคลิน (prostacyclin), อะดีโนซีน (adenosine) และสารประกอบไนตริกออกไซด์ (NO) (Feraci and Brian 1994, Dalkara and Moskowitz 1997) ซึ่งเป็นสารสำคัญในกระบวนการของฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสื่อประสาทเป็นจำนวนมาก เช่น อะเซติลโคลีน (acetylcholine) เป็นต้น และ endothelial dependent

hyperpolarizing factor (EDHF) สำหรับสารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุและมีผลกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (endothelial-derived contractile factors (EDCFs) ซึ่งสารในกลุ่มนี้ที่มีบทบาทสำคัญ คือ เอนโดธีลิน (endothelin) นอกจากนี้เซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุยังมีเอนไซม์ angiotensin converting enzyme ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน angiotensin I ให้เป็น angiotensin II ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์แรงในการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด

ไนตริกออกไซด์เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด (Dalkara and Moskowitz 1997) ลักษณะที่แตกต่างระหว่างบทบาทของไนตริกออกไซด์ ในหลอดเลือดของระบบประสาทส่วนกลางและอวัยวะในระบบอื่น คือ ในสมองและไขสันหลังมีเซลล์หลายชนิดที่สามารถสร้างไนตริกออกไซด์ได้ นอกจากเซลล์เยื่อบุโลหิตแล้ว เซลล์ประสาทในเนื้อสมองหรือในปมประสาทต่างๆ โดยเฉพาะปมประสาทพาราซิมพาเธติกต่างสามารถสร้างไนตริกออกไซด์ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ประสาทเหล่านั้นมีเอนไซม์ nitric oxide synthase (neuronal NOS หรือ nNOS) เซลล์ประสาทที่สามารถสร้าง NO เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการปรับอัตราไหลของเลือดให้เหมาะสมกับการทำงานของเซลล์ประสาท (Iadecola, 1993) ไนตริกออกไซด์ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตอบสนองของหลอดเลือดต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างไรก็ตามไนตริกออกไซด์ที่มีบทบาทในกระบวนการนี้อาจถูกสร้างจากด้านหน้าของสมอง ทั้งนี้เนื่องจากทั้งไนตริกออกไซด์ที่สร้างจากเซลล์ประสาทเฉพาะที่และไนตริกออกไซด์ที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุโลหิตโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (endothelial NOS หรือ eNOS) ไม่มีบทบาทในกระบวนการดังกล่าว (Wang et al 1994, Irikura et al 1995; Fabricius et al 1996)

บทบาทของเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุในกลไกการเกิด autoregulation นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Iadecola et al 1994, Chillon and Baumbach 1997) จากการศึกษาในหลอดเลือดที่แยกออกจากร่างกายพบว่า หลอดเลือดจะสูญเสียความสามารถในการหดตัวเพื่อตอบสนองต่อแรงดัน (serotin induced vasoconstriction) ถ้าหากหลอดเลือดนั้นปราศจากเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุ (Harder 1987, Kamata et al 1987) สำหรับการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการทำลายเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุโดยการนำออกสี จะเป็นผลให้การตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อการลดความดันเลือดเสียไป (Gotoh et al 1987) สัตว์ทดลองที่สารพันธุกรรมของเอนไซม์ nitric oxide synthase ในเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุถูกทำลาย (eNOS knock-out mice) จะมีความผิดปรกติของระบบไหลเวียน กล่าวคือ มีความดันเลือดสูงและมีความบกพร่องในระบบ autoregulation โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะที่มีการลดลงของความดันเลือด (Huang et al, 1995) ซึ่งผลการศึกษาเหล่านี้บ่งชี้ว่า เซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุน่าจะมีความสำคัญต่อกลไกการควบคุมระบบ autoregulation ของหลอดเลือดสมอง อย่างไรก็ตามกลไกของความสัมพันธ์ดังกล่าวยังเป็นข้อถกเถียง เนื่องจากหลักฐานจำนวนมากบ่งชี้ว่าสารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนตริกออกไซด์ไม่มีบทบาทในการควบคุมการเกิด autoregulation (Talman 1995, Thorgeson et al 1996) สมมติฐานที่เป็นไปได้คือเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุอาจทำหน้าที่เป็นตัวรับแรงกล (mechanoreceptor) ซึ่งรับการเปลี่ยนทางกลศาสตร์ที่เกิดขึ้นที่ผนังหลอดเลือด เช่น แรงกดผ่านผนัง (transmural pressure) หรือแรงเสียดสี (shear stress) และถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงนั้นไปสู่ชั้นกล้ามเนื้อ โดยอาจอาศัยการลดการหลั่งสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวหรือเพิ่มการหลั่งสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Rubanyi et al 1990)

ความผิดปรกติของเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุและพยาธิกำเนิดของภาวะสมองบวม (Brain edema)

โดยลักษณะพิเศษของเซลล์เยื่อบุโลหิตเยื่อบุของสมอง ทำให้สารน้ำและสารที่ละลายในน้ำซึมผ่านผนังหลอดเลือดได้อย่างจำกัด ซึ่งเป็นกระบวนการดังกล่าวทำหน้าที่ควบคุมให้ปริมาณของสารน้ำภาย

ในและภายนอกหลอดเลือดมีปริมาณที่เหมาะสม เมื่อสมองมีพยาธิสภาพบางประการเกิดขึ้น การทำงานของ blood brain barrier จะเสียไป กล่าวคือผนังหลอดเลือดยอมให้สารซึ่งมีขนาดโมเลกุลต่างๆเคลื่อนที่ผ่านได้มากกว่าปรกติ การสูญเสียความสามารถในการกักกั้นสารจะเป็นผลให้เกิดการรั่วของสารต่างๆออกสู่เนื้อสมอง และนำไปสู่การเคลื่อนที่ของน้ำ จนเกิดภาวะสมองบวม (brain edema) เรียกภาวะสมองบวมที่เป็นผลจากการสูญเสียสภาพของ blood brain barrier ว่า vasogenic brain edema

การศึกษาโดยการฉีดสารทึบอิเลกตรอน (electron dense material) เช่น horseradish peroxidase และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุโดรีเธียมในพยาธิสภาพต่างๆ เช่น สมองขาดเลือด บ่งชี้ว่า การเพิ่มการขนส่งผ่าน vesicular transport อาจเป็นกลไกสำคัญในการรั่วของสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) จากหลอดเลือด (Beggs and Waggener 1976) ในขณะที่การศึกษาในเซลล์เยื่อบุโดรีเธียมที่เพาะเลี้ยงพบว่าการรั่วของผนังหลอดเลือดน่าจะเป็นผลจากการหดตัวของเซลล์เยื่อบุโดรีเธียม (endothelial cell contraction) ซึ่งเป็นผลให้ช่องระหว่างเซลล์กว้างขึ้นและเกิดการรั่ว (nagy et al 1995) พยาธิสภาพที่ทำให้เซลล์เยื่อบุโดรีเธียมยอมให้สารอณูใหญ่ผ่านได้มากกว่าปรกติ ได้แก่ การได้รับสารที่มี osmolality สูง (osmotic injury), ความดันโลหิตสูง, ภาวะขาด, ภาวะสมองขาดเลือดเหตุออกซิเจน, พิษจากคาร์บอนไดออกไซด์, พิษจากตะกั่ว (lead encephalopathy), ภาวะสมองผิดปรกติจากไตวาย (uremic encephalopathy), ติดเชื้อในสมอง เช่น เนื้องอก, ฝี หรือติดเชื้อเลือด, เยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดเป็นหนอง (purulent meningitis), อันตรายจากการฉายรังสี (radiation injury), สารไมโนบางชนิด, ทารกที่คลอดก่อนกำหนด และภาวะพิษจากสารบีตาลิวูเนิน (bicuculline) การเพิ่มขึ้นของ permeability ของหลอดเลือดจนเกิดการรั่วในภาวะเหล่านี้ เชื่อว่าอาจเกิดจากสารเคมีบางชนิด โดยเฉพาะกลุ่มออโตคอยด์ (autacoid) ซึ่งหลั่งจากเซลล์ที่มีพยาธิสภาพ เช่น แบรดีไคนิน (bradykinin), ฮิสตามีน (histamine), อนุพันธุ์ของกรดอะแรคิโดนิก (arachidonic acid) หรือกลุ่มอนุมูลอิสระ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide: NO) (Schilling and Wald 1997) ในกรณีของโรคเนื้องอกสมอง เซลล์เนื้องอกอาจหลั่งสารบางชนิดที่ทำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ หลอดเลือดที่ขึ้นแจริญขึ้นใหม่อาจมีความผิดปรกติ เช่น มี fenestration และมีการรั่วของสารอณูใหญ่เกิดขึ้น สารดังกล่าว ได้แก่ vascular endothelial growth factor เป็นต้น (Roberts and Palade 1995, Wang et al 1996)

เนื่องจากภาวะสมองบวมประเภทนี้เกิดจากการรั่วของสารอณูใหญ่ออกจากหลอดเลือด ดังนั้นปริมาตรที่เพิ่มขึ้นจึงอยู่ในส่วนของช่องนอกเซลล์ ต่างจากภาวะสมองบวมชนิด cytotoxic brain edema ซึ่งปริมาตรที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากการบวมของเซลล์ (cell swelling) ตำแหน่งที่มีการบวมมากในสมองบวมประเภท vasogenic มักพบในตำแหน่งของ white matter การบวมของสมองที่เกิดขึ้นจะเป็นผลให้ความดันภายในโพรงกะโหลกศีรษะ (intracranial pressure) สูงขึ้น และอาจรุนแรงจนเกิดการเคลื่อนที่ของเนื้อสมอง (brain herniation) ได้ ในกรณีของภาวะเนื้องอกสมอง อาการและอาการแสดงที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลจากการบวมของสมองเป็นหลัก โดยที่ขนาดของก้อนเนื้องอกมีขนาดเล็กก็ได้ ภาวะสมองบวมลักษณะนี้ตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธี osmotic therapy เช่นการให้ mannitol สำหรับสารละลายนี้สามารถลด permeability ของหลอดเลือดและลดภาวะสมองบวมได้ในกรณีของภาวะเนื้องอกสมอง แต่ไม่ได้ผลดีในโรคหลอดเลือดสมอง หรือสมองบวมจากการกระทบกระเทือน

ไนตริกออกไซด์ : ลักษณะทางชีวเคมี

ไนตริกออกไซด์เป็นก๊าซอนุพันธุ์อิสระที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ง่าย ความรู้เกี่ยวกับลักษณะทางเภสัชวิทยาของสารชนิดนี้ เพิ่งที่พราบกันเป็นเวลานานก่อนที่จะพบว่าสารนี้สามารถถูกสร้างขึ้นภายในร่างกายและมีบทบาทสำคัญยิ่งในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด ตัวอย่างเช่น เซลล์หลอดเลือดกลุ่มในตรีก

เช่น nitroprusside, nitroglycerin ซึ่งออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง cyclic guanosine monophosphate (cGMP) เป็นผลให้เกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือดตลอดจนอวัยวะอื่นๆนั้น ในปัจจุบันพบว่ายาในกลุ่มดังกล่าวออกฤทธิ์โดยผ่านการทำงานของไนตริกออกไซด์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดเช่น adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, thrombin, bradykinin, and histamine ต่างออกฤทธิ์ผ่านการทำงานของไนตริกออกไซด์ทั้งสิ้น (Moncada, 1991)

ไนตริกออกไซด์ถูกสร้างขึ้นจากกรดอะมิโน L-arginine โดยอาศัยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้าย cytochrome P450 reductase (Stuehr et al 1991) ในปัจจุบันได้แบ่งเอนไซม์ NOS ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ 2 ชนิดแรกจัดเป็นกลุ่ม constitutive NOS ซึ่งทำงานโดยอาศัยเอนไซม์ Ca^{2+}/calmodulin เอนไซม์ NOS ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ชนิดที่พบในเซลล์เยื่อบุโพรงเลือด (eNOS) และชนิดที่พบในเซลล์ประสาท (nNOS) (Snyder and Bredt 1991) สำหรับชนิดที่สามซึ่งพบในเซลล์แมคโครฟาจ (mNOS) ทำงานโดยอาศัยการกระตุ้นจาก cytokine และไม่ขึ้นกับ calcium ion (Marletta et al 1988) ในปี 1991 Bredt และคณะสามารถ clone gene ของเอนไซม์นี้โดยใช้เนื้อเยื่อจากสมองน้อยของหนูแรท (rat cerebellar NOS) และพบว่า gene ดังกล่าวมีความคล้ายคลึง (homology) กับ gene ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ cytochrome P450 reductase (Bredt et al 1990) เอนไซม์ NOS มีโครงสร้างเป็น flavoprotein ซึ่งประกอบด้วย flavin mononucleotide และ flavin dinucleotide และทำงานโดยอาศัยเอนไซม์ NADPH ทำเป็น cofactor การทำงานของเอนไซม์ NOS จะเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นโดย tetrahydrobiopterin (McCall and Vallance 1992) เอนไซม์ NOS ชนิดต่างๆจะมีความไวต่อการถูกยับยั้งโดย arginine analogues ที่ต่างกัน (Griffith 1995) ตัวอย่างเช่น N^G-nitro-L-arginine จะมีความสามารถในการยับยั้ง Ca^{2+}/calmodulin-dependent NOS ที่พบในเซลล์ประสาทและเซลล์เยื่อบุโพรงเลือด (Lambert et al 1991) ในขณะที่ L-canavanine สามารถยับยั้งเอนไซม์ NOS ชนิดที่พบในเซลล์แมคโครฟาจ (Iyengar et al 1987) แต่ไม่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ NOS ที่พบในสมอง (Knowles et al 1990) และเซลล์เยื่อบุโพรงเลือด (Palmer and Moncada 1989) และ L-N^G-methylarginine สามารถยับยั้งเอนไซม์ NOS ทั้งที่พบในเซลล์แมคโครฟาจและเซลล์ประสาท (Feldman et al 1993)

ไนตริกออกไซด์มีความแตกต่างออกไปจากสารสื่อประสาททั่วไป สารชนิดนี้มิได้ถูกสร้างขึ้นและสะสมไว้ในถุงเก็บสารสื่อประสาท (transmitter vesicle) แต่จะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีความจำเป็นในการใช้ นอกจากนี้การเคลื่อนที่ผ่านเซลล์อาศัยการแพร่ (diffusion) โดยไม่ผ่านกระบวนการ exocytosis และเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (target cell) โดยแพร่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ ดังนั้นกระบวนการเชื่อมสัญญาณ (transduction mechanism) จึงมิได้อาศัยตัวรับบนผนังเซลล์เช่นเดียวกับสารสื่อประสาทประเภทอื่นๆ ไนตริกออกไซด์มีอายุสั้นประมาณ 5 วินาที โดยพบว่าผลที่เกิดกับเซลล์จะลดลงร้อยละ 50 ในเวลา 4 วินาที อนุภาคที่สำคัญที่ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายของไนตริกออกไซด์คือ อนุภาคของ Fe ซึ่งอยู่ภายในเอนไซม์ guanylate cyclase (GC) (Bredt and Snyder 1992) และอาจรวมถึงเอนไซม์อื่นๆ เช่น ADP-ribosyltransferase (Brune and Lapetina 1989) นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ยังจับกับอนุภาคของ Fe ภายในเอนไซม์ภายในไมโตคอนเดรียที่ทำหน้าที่ในการส่งผ่านอิเลคตรอนในกระบวนการ electron transport chain, เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ citric acid cycle และกระบวนการสังเคราะห์ DNA

การค้นพบไนตริกออกไซด์ในสมอง

ในปี 1977 Deguchi ได้รายงานถึงการค้นพบว่าในส่วน soluble fraction ที่สกัดจากสมองส่วนหน้ามีสารอนุภาคเล็กที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ GC และถูกยับยั้งได้โดย hemoglobin (Deguchi 1977) ใน

ไม่เดียวกันนั้น Miki และคณะได้แสดงให้เห็นว่าสารไนตริกออกไซด์มีฤทธิ์กระตุ้นเอนซัยม์ CG ในสมองใหญ่ของหนู (Miki et al 1977) ในระยะต่อมา Deguchi และ Yoshioka ได้รายงานว่าการคอนมิใน L-arginine มีฤทธิ์กระตุ้นเอนซัยม์ CG เช่นเดียวกัน (Deguchi and Yoshioka 1982) โดยอาศัยการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมจากเซลล์ชนิด granule cell ของสมองน้อย Garthwaite และคณะพบว่าสารสื่อประสาท glutamate เมื่อออกฤทธิ์ผ่านตัวรับชนิด NMDA สามารถกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไนตริกออกไซด์ เช่น สารดังกล่าวสามารถหนีย่วนำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด, สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนซัยม์ CG และเพิ่มปริมาณ cGMP. ฤทธิ์ที่เกิดขึ้นถูกยับยั้งโดย hemoglobin และการสลายตัวของสารดังกล่าวถูกยับยั้งได้โดยเอนซัยม์ superoxide dismutase (Garthwaite et al 1988) นอกจากนี้การศึกษาใน synaptosome ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อสมองพบว่าการเติม L-arginine ลงใน synaptosome สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์และ citrulline ตลอดจนเกิดการกระตุ้นเอนซัยม์ CG (Knowles et al 1989) กระบวนการทำงาน L-arginine-nitric oxide pathway ดังกล่าวเป็นกลไกที่ในปัจจุบันยืนยันแล้วว่าเป็นขั้นตอนสำคัญในการกระตุ้นเอนซัยม์ CG ให้สร้าง cGMP

การสร้างไนตริกออกไซด์ในสมอง

ไนตริกออกไซด์ภายในสมองถูกสร้างจากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับในอวัยวะอื่นๆ เซลล์เอนโดธีเลียมในหลอดเลือดสมองสามารถสร้างไนตริกออกไซด์ (Moncada et al 1991) โดยอาศัยเทคนิคทางimmunohistochemistry พบว่ามากในชั้น intimal ของหลอดเลือดสมองขนาดต่างๆพบ NOS immunoreactivity เซลล์ไมโครเกลีย (ซึ่งทำหน้าที่กล้ายเซลล์แมคโครฟาจในเนื้อเยื่ออื่นๆ) ที่ถูกกระตุ้นเป็นเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถสร้างไนตริกออกไซด์ จากหลักฐานที่พบว่า N^G-nitro-arginine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนซัยม์ NOS ชนิด constitutive ซึ่งสร้างจากเซลล์ประสาทไม่สามารถยับยั้งเซลล์ประสาทที่เกิดจากไนตริกออกไซด์บ่งชี้ว่าเอนซัยม์ NOS ที่พบในเซลล์ไมโครเกลียเป็นชนิด inducible (Boje and Arora 1992) นอกจากเซลล์ไมโครเกลียแล้วเอนซัยม์ NOS ยังพบในเซลล์เกลียประเภทอื่นๆด้วย เช่น เซลล์แอสโทรไซต์ เป็นต้น

หลอดเลือดสมองถูกเลี้ยงด้วยเส้นประสาทที่ใช้สารสื่อประสาทชนิดต่างๆเป็นจำนวนมาก ซึ่งรวมไปถึงเส้นประสาทที่ใช้สารไนตริกออกไซด์และสามารถตรวจพบเอนซัยม์ NOS ได้ (Bredt and Snyder 1992) เส้นประสาทที่มีลักษณะเป็น NOS immunoreactive เหล่านี้พบมากในส่วนต้นของหลอดเลือดแดง anterior และ middle cerebral แต่พบน้อยในหลอดเลือดขนาดเล็กในเยื่อหุ้มสมองชั้นพีย (Nozaki et al 1993) เซลล์ประสาทที่เป็นต้นกำเนิดสำคัญของไฟประสาทในไนตริกออกไซด์เหล่านี้ ได้แก่ เซลล์ในปมประสาทซีไลพาทีน ซึ่งเป็นปมประสาทสำคัญในระบบประสาทพาราซิมพาเธติก

นอกจากนี้จากเซลล์เอนโดธีเลียมและเซลล์ประสาทในปมประสาทพาราซิมพาเธติกแล้ว เซลล์ประสาทที่มีเอนซัยม์ NOS ยังสามารถพบได้ในเนื้อสมอง เซลล์เหล่านี้พบได้ในสมองส่วน olfactory bulb, basal forebrain, medulla, hypothalamus, striatum, hippocampus, cerebellum และ cerebral cortex โดยมีความหนาแน่นสูงสุดในสมองส่วน cerebellum และต่ำสุดในก้านสมองส่วน medulla (Forstermann et al 1990) แม้ว่าเซลล์ประสาทไนตริกออกไซด์จะมีจำนวนเพียงร้อยละ 1-2 ของจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมด แต่เซลล์ไนตริกออกไซด์จะให้ไฟประสาทไปยังเซลล์ประสาทเกือบทั้งหมดในสมอง (Dawson et al 1992)

ไนตริกออกไซด์และการควบคุมการไหลเวียนของเลือดในสมอง

ไนตริกออกไซด์เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญยิ่งในการควบคุมการไหลเวียนของเลือดในสมอง (cerebral circulation) การทำงานของสารไนตริกออกไซด์ในกระบวนการนี้มีความซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานของไนตริกออกไซด์ในอวัยวะอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากนอกเหนือจากเซลล์เอนโดธีเลียมแล้ว เซลล์ประสาทและเซลล์เกลียชนิดต่างๆเมื่อได้รับการกระตุ้นสามารถสร้างไนตริกออกไซด์ได้เช่นเดียวกัน

เซลล์เอนโดธีเลียมเป็นเซลล์ที่สำคัญในการสร้างสารไนตริกออกไซด์ในหลอดเลือดสมอง (Bredt and Snyder 1992) จากการศึกษาในหลอดเลือดสมองที่ตัดแยกออกจากร่างกายพบว่า หลอดเลือดที่มีชั้นของเซลล์เอนโดธีเลียมจะมีปริมาณของ cGMP สูงกว่าหลอดเลือดที่ขาดชั้นของเซลล์เอนโดธีเลียมออก (Toda and Okumura 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าการให้สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ NOS สามารถลดปริมาณของ cGMP และเป็นผลให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าไนตริกออกไซด์ที่สร้างจากเซลล์เอนโดธีเลียมมีบทบาทสำคัญในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดในภาวะปรกติ (basal state) (Moncada et al 1991, Kanai et al 1991) ข้อสรุปดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง (in vivo experiment) ซึ่งพบว่าการให้สารที่ยับยั้งเอนไซม์ NOS ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดสมองในสัตว์สารทดลองต่างๆ (Faraci 1990 and 1991, Rosenblum et al 1990, Kelly et al 1995, Irikura et al 1995, Yang, 1996) และลดปริมาณการไหลของเลือดในสมอง (cerebral blood flow) ในภาวะพัก (Kovach et al 1992, Iadecola et al 1993, Pelligrino et al 1993) ไนตริกออกไซด์มีผลต่อความตึงตัวของหลอดเลือดขนาดใหญ่มากกว่าหลอดเลือดขนาดเล็ก (Faraci 1991a)

ไนตริกออกไซด์ที่สร้างขึ้นในภาวะพัก (basal NO formation) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการต้านฤทธิ์ของสารเคมีที่ฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดสมองหดตัว สารเคมีดังกล่าว ได้แก่ norepinephrine (Bankhight et al, 1992), serotonin (Trezise et al, 1992) และ prostaglandins (Nakagomi et al, 1988) การที่ไนตริกออกไซด์สามารถต้านฤทธิ์ของ epinephrine บ่งชี้ว่าสารนี้น่าจะมีบทบาทในการปรับ (modulation) การตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติก นอกจากผลที่มีต่อหลอดเลือดแล้ว ไนตริกออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้นในภาวะพักยังอาจมีบทบาทในการต้านการเกาะตัวของเกร็ดเลือดและเม็ดเลือดขาว (aggregation) รวมไปถึงการเกาะติด (adhesion) ของเซลล์ดังกล่าวที่ผนังของหลอดเลือดด้วย

บทบาทของไนตริกออกไซด์ในพยาธิกำเนิดของภาวะไมเกรน

ได้มีผู้ตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับบทบาทของไนตริกออกไซด์ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน ทั้งนี้เนื่องจากผลของไนตริกออกไซด์ที่มีต่อหลอดเลือดสมองมีลักษณะที่ต่างจากหลอดเลือดคาริเวลอื่น จากการศึกษาของ Iversen พบว่าหลอดเลือดคาริเวลศีรษะจะตอบสนองต่อไนตริกออกไซด์มากกว่าหลอดเลือดคาริเวลอื่น ซึ่งการตอบสนองนี้จะรุนแรงมากขึ้นเมื่อให้ *N*-acetylcysteine ซึ่งเป็นสารที่แตกตัวให้กลุ่มซัลฟไฮดริล (sulfhydryl group) และจำเป็นในการออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (Iversen 1992) นอกจากนี้ระหว่างการให้ไนตริกออกไซด์ทางเข้าทางหลอดเลือดดำยังทำให้อาสาสมัครเกิดอาการปวดศีรษะ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยไมเกรน (Iversen et al, 1989) ในระยะหลังได้มีผู้ศึกษาความสัมพันธ์ของไนตริกออกไซด์และพยาธิกำเนิดของโรคไมเกรนไมเกรน ในปี 1993 Thomsen และคณะได้ศึกษาฤทธิ์ของ nitroglycerin (ซึ่งออกฤทธิ์โดยการเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์) โดยการหยดเข้าหลอดเลือดดำและศึกษาผลในการกระตุ้นให้เกิดอาการปวดศีรษะตลอดจนเปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลเวียนของเลือดภายในกะโหลกศีรษะ (ศึกษาโดยใช้ transcranial Doppler) ผลการศึกษาพบว่า ในผู้ป่วยโรคไมเกรนจะมีการขยายตัวของหลอดเลือดรวมทั้งอาการปวดศีรษะมาก

กว่ากลุ่มควบคุม (Thompsen et al, 1993) ซึ่งผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า ผู้ป่วยไมเกรนน่าจะมีความไวต่อไนตริกออกไซด์มากกว่าในคนปรกติ (NO supersensitivity) และความผิดปรกตินี้อาจเป็นกลไกสำคัญในการเกิดอาการปวดศีรษะ (Olesen et al, 1996) การศึกษาในสัตว์ทดลองโดยกระตุ้นให้เกิด spreading depression (ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ทางสรีรวิทยาที่เชื่อว่าเป็นรากฐานของการเกิดอาการนำในภาวะไมเกรน) ด้วยโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) และศึกษาปริมาณของเอนไซม์ NOS ในเซลล์เดนไดรทิสิส ผลการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มขึ้น (up-regulation) ของ NOS ในเซลล์ดังกล่าวทั้งที่สมองส่วน cerebral cortex และ striatum (Chopp et al, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่ายาในกลุ่ม 5-$HT_{1B/1D}$ agonists สามารถลดการกระตุ้น NOS และปริมาณของ NO ที่เกิดขึ้นเมื่อกระตุ้นให้สมองเกิด CSD ผลการศึกษานี้ประจักษ์ถึงบทบาทของเซลล์เดนไดรทิสิสและ NO ในการเกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่เกิดตามหลังภาวะ cortical spreading depression จากหลักฐานทั้งในสัตว์ทดลองและในคนดังที่กล่าวข้างต้นต่างบ่งชี้ถึงบทบาทของไนตริกออกไซด์ในการเกิดภาวะไมเกรน

นอกจากผลของ NO ที่มีต่อหลอดเลือดแล้ว ในปัจจุบันได้มีผู้ตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับบทบาทของ NO ในการเกิดภาวะไวต่อการปวดมากกว่าปรกติ (hyperalgesia) โดยเชื่อว่า NO ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น retrograde neuronal messenger กล่าวคือเป็นสารเคมีที่สร้างขึ้นจากเซลล์ประสาท postsynaptic และไปมีผลต่อเซลล์ประสาท presynaptic อาจจะมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสัมผัสประสาท (synaptic plasticity) ที่บริเวณ dorsal horn ของไขสันหลัง เป็นผลให้มีการหลั่งสารเคมีที่ส่งผ่านสัญญาณประสาทในการรับความเจ็บปวด เช่น SP, CGRP, NKA หรือ glutamate เพิ่มขึ้น (ในทำนองเดียวกับการเกิด long-term potentiation ซึ่งเป็นกลไกในการเกิดการเรียนรู้) เป็นผลให้เกิดการเจ็บปวดมากกว่าปรกติ เรียกขบวนการนี้ว่า central sensitization จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการให้ NG-nitro-L-arginine methyl ester ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ สามารถลดอาการปวดที่เกิดจากการฉีดฟอร์มาลีนเข้าใต้ผิวหนัง (Coderre and Yashpal, 1994) การศึกษาทาง immunohistochemistry ยืนยันว่าเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ trigeminal มีเอนไซม์ NOS ซึ่งแสดงว่า ไนตริกออกไซด์มีบทบาทในกระบวนการรับความเจ็บปวดจากอวัยวะภายในศีรษะ (Dohm and Ben, 1994) รวมไปถึงกระบวนการเกิด central sensitization

ซีโรโตนินและพยาธิกำเนิดของโรคไมเกรน

ซีโรโตนินเป็นสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญ ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทส่วนปลาย ส่วนใหญ่ของซีโรโตนินที่ตรวจพบในร่างกายอยู่ที่เซลล์ enterochromaffin ในผนังลำไส้เล็ก, สมอง, ต่อมไพนีอล (pineal gland) และเซลล์เกร็ดเลือด ในระบบประสาทเซลล์ที่สร้างซีโรโตนินจะรวมตัวกันอยู่ในแนวกึ่งกลางของก้านสมองเรียกว่ากลุ่มเซลล์ nucleus raphe เซลล์ซีโรโตนินเหล่านี้จะให้แขนงประสาทกระจายไปยังส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลัง และทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ เช่น วงจรการหลับ-ตื่น การควบคุมอารมณ์ และที่สำคัญ คือ ระบบการปรับความเจ็บปวด ภาวะบ่งพร่องซีโรโตนินที่เกิดจากสาเหตุต่างๆ สามารถกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดในบริเวณต่างๆของร่างกายได้ (Sicuteri and Nicolodi, 1996) เช่นเดียวกับส่วน dorsal horn ของไขสันหลัง ใยประสาทซีโรโตนินที่ผ่านลงมาทาง dorsolateral fasciculus จะมาสิ้นสุดที่เซลล์ประสาทของกลุ่มเซลล์โพรงสมองมีนาคอยดาลิส และทำหน้าที่ปรับเปลี่ยนกระบวนการรับความรู้สึกเจ็บปวดที่มาจากหลอดเลือดและอวัยวะอื่นๆในโพรงกะโหลกศีรษะ

นอกจากผลต่อเซลล์ประสาทแล้ว ซีโรโตนินยังมีผลต่อความตึงตัวของหลอดเลือด โดยอาจทำให้หลอดเลือดหดตัวหรือคลายตัวทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความไวต่อของหลอดเลือด ฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการคลายตัวเชื่อ

ว่าเกิดจากผลโดยตรงต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดเอง และโดยอ้อม คือผ่านกระบวนการที่ต้องอาศัยเซลล์บุหลอดเลือด รวมทั้งเป็นผลจากการยับยั้งการหลั่งนอร์อดรีนาลีน ส่วนผลที่กระตุ้นให้เกิดการหดตัวเกิดจากการกระตุ้นตัวรับชนิด $5HT_{1B}$ หรือ $5HT_2$ ในหลอดเลือด (Ferrari and Saxena, 1993)

ความสัมพันธ์ระหว่างซีโรโตนินและการเกิดโรคปวดศีรษะไมเกรนเป็นข้อสังเกตที่พบมากว่า 30 ปี โดยเริ่มจากการศึกษาของ Sicuteri และคณะในปี 1961 ซึ่งพบว่าระหว่างที่ผู้ป่วยไมเกรนเกิดอาการปวดศีรษะจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA) ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ที่สำคัญของซีโรโตนิน (Sicuteri et al, 1961) การเพิ่มขึ้นของระดับของสารดังกล่าวเกิดร่วมกับการลดลงของปริมาณของซีโรโตนินในเซลล์เกร็ดเลือด (Anthony et al, 1969) และการเพิ่มขึ้นของระดับซีโรโตนินในพลาสมา (Ferrari et al, 1989) จากการศึกษาในระยะหลังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับซีโรโตนินและเมตาบอไลท์ในเซลล์เกร็ดเลือดมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับระดับในสมองและน้ำไขสันหลัง (Kovacs et al, 1989) จากการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าในระยะปวดศีรษะไมเกรน ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพบางประการที่กระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยซีโรโตนินออกจากตำแหน่งเก็บ (storage site) ซึ่งการปลดปล่อยซีโรโตนินนี้น่าจะมีส่วนสำคัญในพยาธิกำเนิดของภาวะปวดศีรษะ จากการศึกษาในระยะหลังพบว่าการลดต่ำลงของปริมาณซีโรโตนินมีความสัมพันธ์กับความถี่ของการเกิดอาการปวดศีรษะ (Srikiatkhachorn and Anthony, 1996a) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยไมเกรนมีความผิดปรกติอื่นๆของระบบซีโรโตนิน เช่น ในเซลล์เกร็ดเลือดของผู้ป่วยไมเกรนมีความสามารถในการเก็บกลับ (uptake) ซีโรโตนินต่างจากกลุ่มควบคุม โดยมีค่าคงที่ Michaelis-Menten (Km) สูงกว่าคนปรกติ (Hannah et al 1991) รวมทั้งมีการลดต่ำลงของการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ซึ่งทำหน้าที่สลายซีโรโตนิน (Ferrari et al, 1989)

ข้อมูลทางคลินิกได้ยืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่างซีโรโตนินและการเกิดโรคปวดศีรษะไมเกรน จากการสังเกตอาการของผู้ป่วยที่ได้รับยา reserpine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเก็บกลับของซีโรโตนิน พบว่าผู้ป่วยเกิดอาการปวดศีรษะที่มีลักษณะเดียวกับอาการปวดศีรษะไมเกรน และอาการดังกล่าวสามารถบรรเทาได้โดยการให้ซีโรโตนิน (Kunkel et al, 1960) นอกจากนี้ยาที่มีฤทธิ์ดีในการบำบัดหรือป้องกันอาการปวดศีรษะไมเกรนจำนวนมากออกฤทธิ์โดยผ่านตัวรับซีโรโตนิน กล่าวคือ ยาในกลุ่ม $5HT_1$ agonist ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นตัวรับซีโรโตนินชนิด $5HT_1$ เช่น sumatriptan หรือ 311C90 มีคุณสมบัติในการลดอาการปวดศีรษะ ในขณะที่ยาในกลุ่ม 5HT2 antagonist ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของตัวรับซีโรโตนินชนิด $5HT_1$ ให้ผลดีในการป้องกันอาการปวดศีรษะ (Ferrari and Saxena, 1993) การศึกษาในระยะหลังบ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงของตัวรับซีโรโตนินมีความสัมพันธ์กับความถี่ของอาการปวดศีรษะ โดยที่อาการปวดศีรษะจะลดลงเมื่อปริมาณตัวรับ $5HT_2$ ลดลง (Govitrapong et al, 1992) และความถี่สูงขึ้นเมื่อปริมาณตัวรับสูงขึ้น (Srikiatkhachorn et al, 1994; Srikiatkhachorn and Anthony, 1996b)

จากข้อมูลทางคลินิกและการศึกษาทางห้องปฏิบัติการดังที่ได้กล่าวข้างต้น ต่างยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงและบทบาทของซีโรโตนินในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน ความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเป็นผลของความผิดปรกติของซีโรโตนินที่มีต่อระบบการควบคุมหลอดเลือด, ระบบการควบคุมการรับความเจ็บปวด หรือทั้งสองระบบ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ความสัมพันธ์ระหว่างซีโรโตนินและไนตริกออกไซด์

การทำงานของสารเชื่อประสาททั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ตัวอย่างเช่น การออกฤทธิ์ของซีโรโตนินเพื่อกระตุ้นให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กเป็นกลไกที่ต้องอาศัยไนตริกออกไซด์จาก

เซลล์เยื่อบุโพรงเลือด (Bruning et al, 1993) ในขณะที่ในดริกออกไซด์เองมีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดใหญ่ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยซีโรโตนิน (Farai and Heisted, 1992) การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงและการศึกษาใน synaptosome พบว่าในดริกออกไซด์มีส่วนในการควบคุมการเก็บกลับ (reuptake) ของซีโรโตนิน (Miller and Hoffman, 1994; Pogun et al, 1994) สำหรับการศึกษาในสัตว์ (in vivo study) พบว่าในดริกออกไซด์มีบทบาทในการควบคุมการปลดปล่อย (release) ของซีโรโตนินในสมองส่วน striatum (Guevara-Guzman et al, 1994), ส่วน preoptic (Lorrain and Hull, 1993) ในทางกายวิภาคได้มีการศึกษาถึงการกระจายของสารสื่อประสาททั้งสองในระบบประสาทส่วนกลาง จากการศึกษาของ Wotherspoon และคณะพบว่าในตำแหน่งของ nucleus raphe ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ซีโรโตนินที่สำคัญ มีไซประสาทที่มีเอนไซม์ NOS ซึ่งแสดงว่าในดริกออกไซด์อาจมีส่วนในการควบคุมการทำงานของระบบซีโรโตนิน (Wotherspoon et al, 1994) เนื่องจากสารสื่อประสาททั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงในระบบใดระบบหนึ่งย่อมสามารถส่งผลต่อการทำงานของอีกระบบได้ จากการศึกษาของ Ito และคณะพบว่าการยับยั้งการสร้างในดริกออกไซด์เป็นเวลานานสามารถทำให้หลอดเลือดมีความไวต่อซีโรโตนินมากกว่าปรกติ (Ito et al, 1995) ซึ่งอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงในจำนวนหรือความสามารถในการตอบสนองของตัวรับ (Kadokami et al, 1996)

จากการศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าทั้งซีโรโตนินและในดริกออกไซด์ซึ่งต่างมีบทบาทในการควบคุมการรับความเจ็บปวดและระบบการควบคุมหลอดเลือด กระบวนการทั้งสองเป็นกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคไมเกรน ดังนั้นความผิดปรกติที่เกิดขึ้นต่อระบบซีโรโตนินหรือระบบในดริกออกไซด์ หรือความสัมพันธ์ในการทำงานของระบบดังกล่าว จึงน่าจะมีส่วนในพยาธิกำเนิดของภาวะนี้

สรุป : จากการศึกษาทั้งหมดข้างต้นปรากฏว่า ซีโรโตนินและในตริกออกไซด์เป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในระบบรับความเจ็บปวดและระบบการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดในโพรงกะโหลกศีรษะ การเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาททั้งสองย่อมส่งผลให้เกิดความผิดปรกติในระบบการควบคุมหลอดเลือด ซึ่งอาจทำให้มีการขยายตัวมากกว่าปรกติและเป็นผลให้เกิดอาการปวดศีรษะ เนื่องจากในปัจจุบันความสัมพันธ์ระหว่างสารสื่อประสาททั้งสองในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะจากหลอดเลือดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คณะผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการวิจัยนี้ขึ้น เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าว ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทั้งทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาเมื่อมีความผิดปรกติของระบบทั้งสอง โดยใช้การวัดอัตราการไหลของเลือดในหลอดเลือดสมอง, ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาทั้งในระดับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ตลอดจนศึกษาการแสดงออกของ c-fos ในกลุ่มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบการรับความเจ็บปวด

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของ nitric oxide ที่มีต่อหลอดเลือดแดงและระบบการรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดของสมอง
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดที่ตอบสนองต่อสาร nitric oxide
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง serotonin และ nitric oxide ในการควบคุมหลอดเลือดสมอง
4. เพื่อศึกษาผลของภาวะพร่อง serotonin ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ nitric oxide
5. เพื่อศึกษาผลของภาวะพร่อง serotonin ต่อระบบการรับความเจ็บปวดของหลอดเลือดในโพรงกะโหลกศีรษะ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงบทบาทของสาร serotonin และ nitric oxide ในการควบคุมระบบการไหลเวียนของเลือดในสมอง
2. เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงบทบาทของสาร serotonin และ nitric oxide ในการควบคุมระบบการรับความเจ็บปวดของหลอดเลือดสมอง
3. เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงบทบาทของสาร serotonin และ nitric oxide ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน
4. เพื่อเป็นรากฐานในการพัฒนายาที่ใช้ในการบรรเทาอาการปวด โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่มีผลต่อระบบ serotonin
5. เพื่อเป็นพัฒนาแบบจำลอง (model) ของโรคไมเกรนในสัตว์ทดลองซึ่งจะได้ใช้เป็นเครื่องมือ ในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานของโรคนี้ต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยที่ได้นำเสนอไว้ประกอบด้วยการศึกษาต่อไป 5 การศึกษา ดังนี้

1. ศึกษาผลของ nitric oxide ต่อระบบการควบคุมหลอดเลือดสมอง
2. ศึกษาผลของ nitric oxide ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดสมอง
3. ศึกษาผลของ nitric oxide ต่อระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง
4. ศึกษาผลของ serotonin ต่อการออกฤทธิ์ของ nitric oxide
5. ศึกษาผลของ serotonin ต่อการแสดงออกของ Fos ซึ่งกระตุ้นโดย nitric oxide

EXPERIMENTAL METHODS AND RESULTS

- Effect of nitric oxide on pial microcirculation: an intravital fluorescein microscopic monitoring
- Effect of nitric oxide on ultrastructure of cerebral microvessels
- Effect of nitric oxide on Fos immunoreactivity in brainstem neurons
- Effect of serotonin depletion on nitric oxide-induced cerebral vascular responses
- Effect of serotonin depletion on nitric oxide-induced Fos immunoreactivity in brainstem neurons

การศึกษาที่ 1.

การศึกษาผลของ nitric oxide ต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดชั้นเพียงของเยื่อหุ้มสมอง โดยใช้เทคนิค intravital fluorescent video-microscope monitoring

เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนเลือดในเส้นเลือดฝอยบริเวณผิวสมอง โดยวิธี intravital fluorescent video-microscope monitoring การติดฉลากสารโมเลกุลใหญ่ เช่น dextran หรือเซลล์เม็ดเลือดด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ และศึกษาการไหลของเลือดในสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่

วิธีการศึกษา

ศึกษาโดยใช้หนูพันธุ์ Wistar ไม่จำกัดเพศ นำมาทำให้สลบโดยใช้ pentobarbital ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากสัตว์ทดลองสลบแล้ว ทำการเจาะคอและใส่ท่อช่วยหายใจ (tracheostomy) จากนั้นควบคุมการหายใจของสัตว์ทดลองโดยใช้เครื่องช่วยหายใจสำหรับสัตว์ (animal respirator) เปิดแผลผ่าตัดบริเวณโคนขาเพื่อสวนท่อเข้าในหลอดเลือดดำฟีมอราล เพื่อใช้ในการให้ยา และสวนท่อในหลอดเลือดแดงฟีมอราลเพื่อใช้เก็บตัวอย่างเลือดสำหรับวัดก๊าซและความเป็นกรด-ด่างของเลือด (blood gas analysis) หลังจากนั้นทำการผ่าตัดเปิดกะโหลกศีรษะ (craniectomy) แทนฝากะโหลกศีรษะออก วางช่องหน้าต่าง (window) ที่สร้างจากโลหะปลอดสนิม (stainless steel) มีรูปร่างเป็นวงแหวน มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 7 มิลลิเมตร เชื่อมวงแหวนหน้าต่างกับกะโหลกศีรษะให้แน่น หล่อเลี้ยงเนื้อสมองที่เปิดออกโดยผ่านน้ำไขสันหลังเทียม (artificial cerebrospinal fluid) เข้าในช่องหน้าต่าง ศึกษาขนาดและอัตราเร็วในการไหลของเลือดในหลอดเลือดฝอยชั้นเยื่อหุ้มสมองโดยวิธี fluorescence video-microscope monitoring ระหว่างการศึกษาทันทีที่การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ และความดันเลือดโดยเครื่อง polygraph (6000-M polygraph, Nihon Koden)

การให้ยาที่เป็น Nitric oxide donor

เริ่มทำการศึกษาโดยฉีด nitroglycerine ในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าทางหลอดเลือดดำโดยใช้เครื่อง infusion pump และควบคุมอัตราการฉีดให้สัตว์ทดลองได้ยาทั้งหมดภายใน 5 นาที

วิธี intravital fluorescent video-microscope monitoring

ทำการศึกษาโดยใช้สารที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งได้แก่ FITC-dextran เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ที่ติดกับ dextran มีน้ำหนักโมเลกุล 150,000 เนื่องจากสารนี้มีขนาดใหญ่ในภาวะปรกติจะไม่มีการรั่วออกสู่ภายนอก ยกเว้นในกรณีที่มีการรั่วของ blood-brain barrier หลังจากให้สารฟลูออเรสเซนต์แล้ว ศึกษาลักษณะของหลอดเลือดในสมองผ่านบริเวณช่องหน้าต่างที่เตรียมไว้ ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ (Nikon-Optiphot 2) บันทึกภาพของหลอดเลือดด้วยกล้องบันทึกวิดีทัศน์ (SIT Camera, DAGE) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Global Lab Image Software

Statistical Analysis

แสดงผลของค่าที่วัดได้เป็น arithmetic mean (SD) และ 95% confidence interval เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในเวลาต่างๆ โดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) for repeated measurement กำหนดค่าความผิดพลาดทางสถิติที่ type 1 error < 5% หรือ ค่า $P < 0.05$

ผลการศึกษา

การให้ยา nitroglycerin ซึ่งเป็น vasodilating agent ทำให้เกิดการลดลงของความดันเลือด (systemic blood pressure) โดยค่าเฉลี่ยของ mean arterial pressure ที่เวลา 0, 5, 15, 30 และ 60 นาทีหลังให้ยาเท่ากับ 108.3 (10.4), 96.0 (4.9), 101.7 (4.7), 103.3 (4.7) และ 103.3 (4.7) mmHg ตามลำดับ ค่าความต่างของ mean arterial pressure ระหว่างเวลาที่ 0 และ 5 นาที เท่ากับ 13.3 (7.2) mmHg (95% confidence interval = 3.4 to 21.3, P = 0.019) หลังจากหลอดลมเกร็งความดันเลือดแดงกลับขึ้นมาอยู่ในระดับปรกติ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ pH, PaO_2 หรือ $PaCO_2$ ตลอดการศึกษา

โดยเทคนิค fluorescent video-microscope monitoring ทำให้สามารถเห็นหลอดเลือดขนาดเล็กบริเวณผิวสมองได้ชัดเจน การฉีดสารฟลูออเรสซนต์ของโมเลกุลของ dextran ทำให้สามารถประเมินขนาดของหลอดเลือดขนาดเล็กตั้งแต่ระดับ arteriole จนถึงระดับ capillary ภาพที่ 1.1 แสดงลักษณะของหลอดเลือดฝอยที่ผิวสมอง ก่อนและหลังให้ยา nitroglycerin ซึ่งพบการขยายของหลอดเลือด รายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.1 ถึง 1.6 เมื่อเปรียบเทียบเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดฝอย ก่อนและหลังรับยาพบว่า การขยายตัวของหลอดเลือด (vascular dilation) เกิดขึ้นมากที่สุดที่เวลา 15 นาที และคงอยู่เป็นเวลานานกว่า 60 นาที การเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี ANOVA for repeated measurement with posthoc Bonferroni test พบว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดที่วัดที่เวลา 0, 5 และ 15 นาทีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รายละเอียดในตารางที่ 1.7) เมื่อเปรียบเทียบผลการตอบสนองพบว่า หลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 micrometer จะมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าหลอดเลือดขนาดใหญ่ การเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดที่เวลา 15 นาทีในหลอดเลือดขนาดต่ำกว่า 10 micrometer , 10-30 micrometer และ 30-60 micrometer เท่ากับ 106.3 (36.1), 55.6 (34.1) และ 33.9 (19.2) % ตามลำดับ (คำนวณเป็นร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก, P = 0.003, ANOVA) เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของหลอดเลือดที่มีขนาดระหว่าง 10-30 micrometer และ 30-60 micrometer พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 1.2) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการรั่วของสาร FITC-dextran ออกนอกหลอดเลือด ซึ่งแสดงว่าไม่มีการเสีย permeability ของหลอดเลือด อันบ่งชี้ว่าเซลล์แทนไซต์เลียมยังควบคุม blood-brain barrier ได้

ตารางที่ 1.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในชั้นเพียบนผิวสมองใหญ่ ก่อนและหลังได้รับยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที ศึกษาในหลอดเลือดฝอยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 micrometer

Number	Control	5 min	15 min	30 min	60 min
1	8	11	15	13	13
2	9	10	11	10	10
3	8	17	17	15	15
4	10	14	14	12	12
5	10	15	16	16	16
6	9	12	12	12	13
7	10	11	13	13	13
8	9	9	10	11	11
9	9	10	10	11	11
10	10	12	12	12	12

ตารางที่ 1.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในชั้นเพียบนผิวสมองใหญ่ ก่อนและหลังได้รับยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที ศึกษาในหลอดเลือดฝอยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 micrometer แสดงผลเป็นร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก (% of control)

Number	Control	5 min	15 min	30 min	60 min
1	100	137.5	187.5	162.5	162.5
2	100	125.0	137.5	125.0	125.0
3	100	188.9	188.9	166.7	166.7
4	100	140.0	140.0	120.0	120.0
5	100	150.0	160.0	160.0	160.0
6	100	133.3	133.3	133.3	144.4
7	100	110.0	130.0	130.0	130.0
8	100	100.0	111.1	122.2	122.2
9	100	111.1	111.1	122.2	122.2
10	100	120.0	120.0	120.0	120.0

ตารางที่ 1.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในชั้นเพียนผิวสมองใหญ่ ก่อนและหลังได้รับยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที ศึกษาในหลอดเลือดฝอยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 11-30 micrometer

Number	Control	5 min	15 min	30 min	60 min
1	16	20	20	22	20
2	28	33	30	30	30
3	29	34	32	32	32
4	23	25	25	25	25
5	14	18	15	15	15
6	23	29	25	25	25
7	28	33	36	36	34
8	30	37	37	37	35
9	17	25	18	18	18
10	21	27	29	29	26

ตารางที่ 1.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในชั้นเพียนผิวสมองใหญ่ ก่อนและหลังได้รับยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที ศึกษาในหลอดเลือดฝอยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 11-30 micrometer แสดงผลเป็นร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก (% of control)

Number	Control	5 min	15 min	30 min	60 min
1	125.0	125.0	125.0	137.5	125.0
2	113.8	110.8	110.3	103.5	103.5
3	117.2	117.2	117.2	110.3	110.34
4	108.7	108.7	117.4	108.7	108.7
5	128.6	128.6	114.3	107.1	107.1
6	126.1	126.1	121.7	108.7	108.7
7	117.9	117.9	117.9	128.6	121.4
8	119.4	119.4	119.4	119.4	112.9
9	147.1	147.1	147.1	105.9	105.9
10	128.6	128.6	133.3	138.1	123.8

ตารางที่ 1.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในชั้นเยื่อบนผิวสมองใหญ่ ก่อนและหลังได้รับยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที ศึกษาในหลอดเลือดฝอยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 31-60 micrometer

Number	Control	5 min	15 min	30 min	60 min
1	40	44	48	50	49
2	36	38	42	44	44
3	32	40	35	35	32
4	57	57	65	64	57
5	54	64	62	60	57
6	50	57	54	54	52
7	42	54	50	50	50
8	60	61	64	60	60
9	35	38	38	38	38
10	56	56	59	59	58

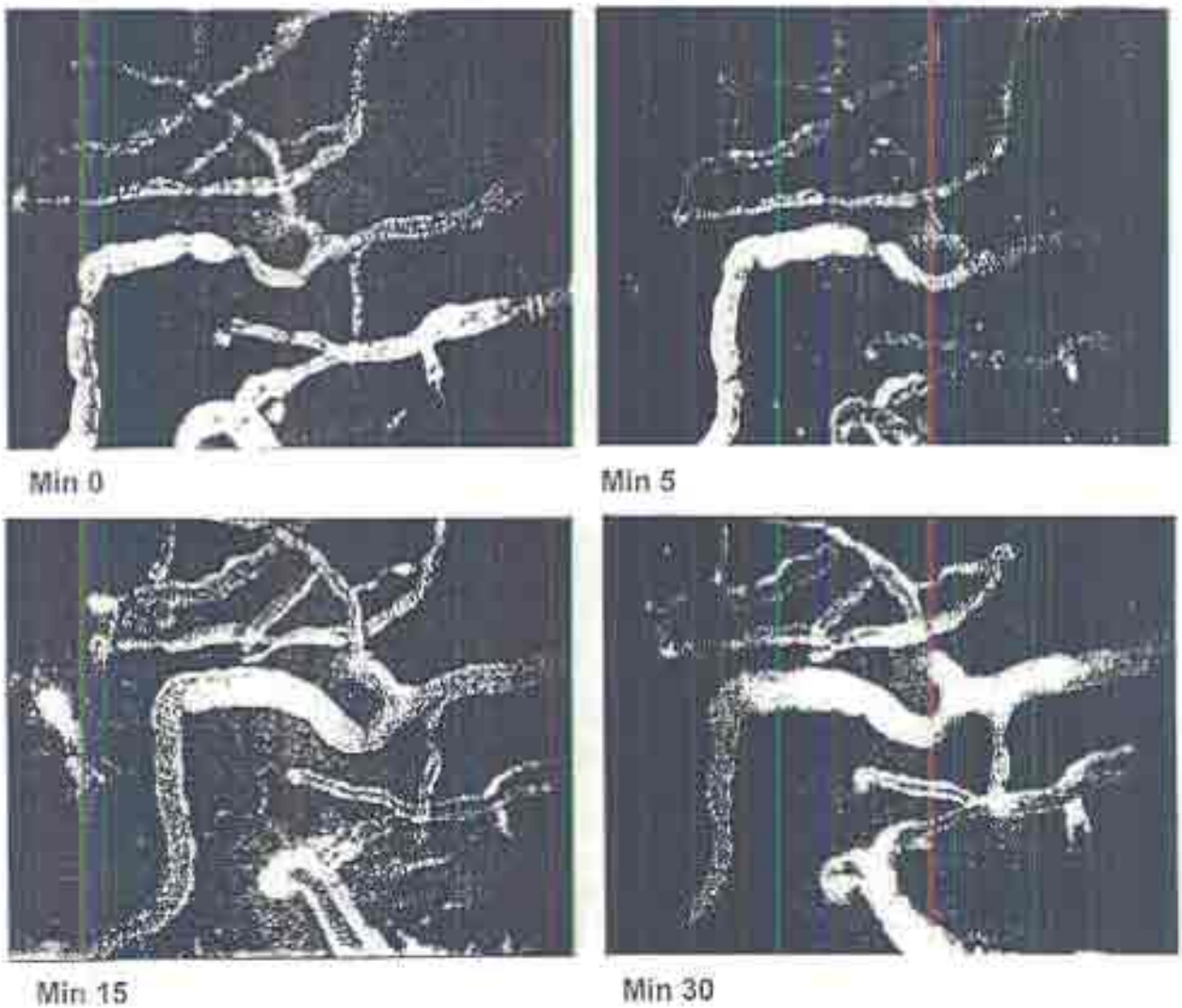
ตารางที่ 1.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในชั้นเยื่อบนผิวสมองใหญ่ ก่อนและหลังได้รับยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที ศึกษาในหลอดเลือดฝอยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 31-60 micrometer แสดงผลเป็นร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก (% of control)

Number	Control	5 min	15 min	30 min	60 min
1	100	110.0	120.0	125.0	122.5
2	100	105.6	116.7	122.2	122.2
3	100	125.0	109.38	109.4	100.0
4	100	100.0	114.0	112.3	100.0
5	100	118.5	114.8	111.1	105.6
6	100	114.0	108.0	108.0	104.0
7	100	128.6	119.1	19.1	119.1
8	100	101.7	106.7	100.0	100.0
9	100	108.6	108.6	108.6	108.6
10	100	100.0	105.4	105.4	103.6

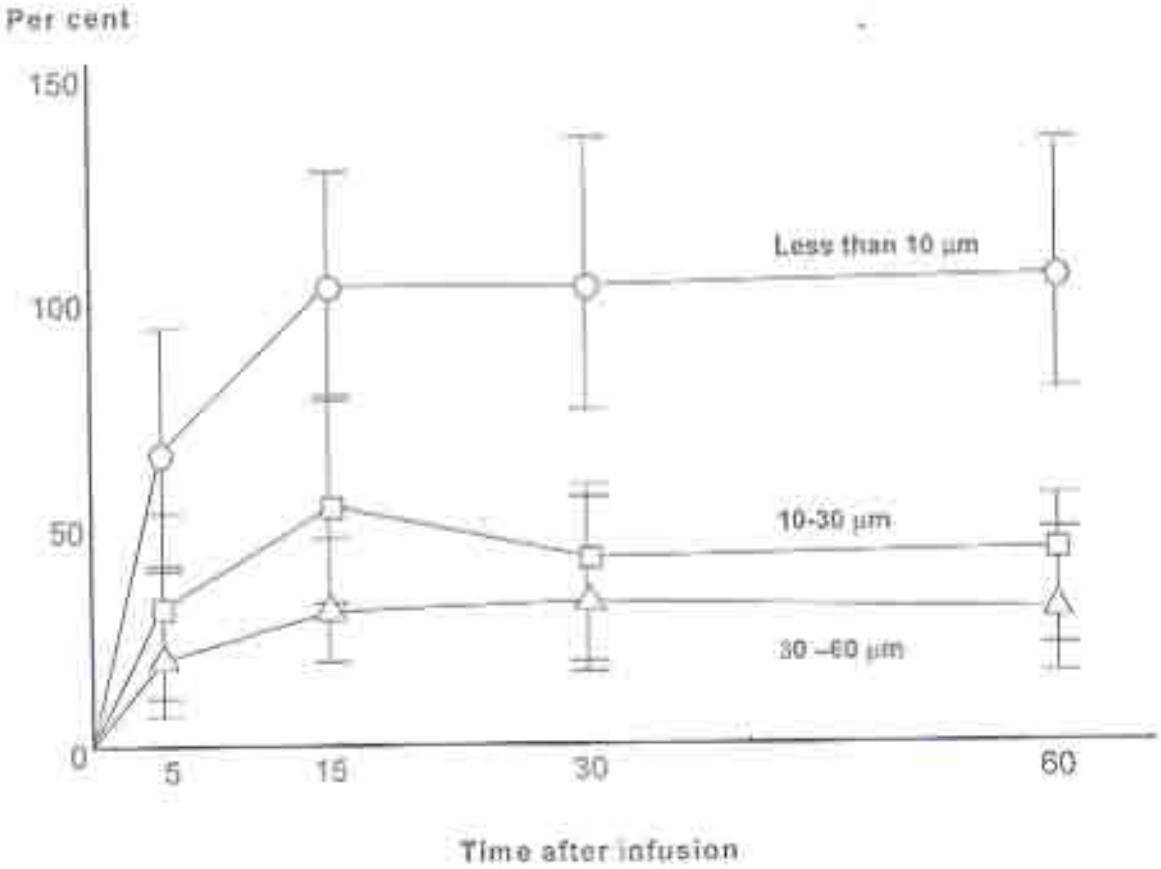
ตารางที่ 1.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในชั้นเพียบนผิวสมองใหญ่ ก่อนและหลังได้รับยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30, และ 60 นาที แสดงผลเป็นร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก (% of control) ผลการศึกษาพบว่าหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 10 micrometer จึงจัดเป็นหลอดเลือด capillary มีการคลายตัวมากกว่าหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 micrometer ในทุกช่วงของการวัด (P value < 0.001, ANOVA for repeated measurement) แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงเป็น mean (SD) และ 95% confidence interval ของร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก

Change in Pial Vessel Diameter (Per Cent of Baseline)				
Vessels	Min 5	Min 15	Min 30	Min 60
Capillary (≤ 10 μm)	68.1 (40.5) 39.1 to 97.1	106.3 (36.1) 80.4 to 132.1	106.2 (46.5) 72.9 to 139.5	109.1 (40.1) 80.1 to 138.1
Arteriole (10 – 30 μm)	32.4 (28.1) 12.3 to 52.3	55.6 (34.1) 31.2 to 79.9	40.4 (25.9) 21.9 to 59.0	42.6 (25.9) 24.1 to 61.1
Arteriole (30 – 60 μm)	22.7 (18.2) 9.7 to 35.7	33.9 (19.2) 20.2 to 47.6	36.7 (23.3) 20.1 to 53.4	33.3 (20.7) 18.5 to 48.1

ภาพที่ 1.1 แสดงภาพของหลอดเลือดที่บันทึกโดยวิธี intravital fluorescent video-microscope monitoring โดยใช้ FITC-labeled dextran (MW 150,000) เป็นสารแสดงฟลูออเรสซนต์ เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการให้ยา nitroglycerin ในภาพแสดงหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 ไมโครเมตร



ภาพที่ 1.2 เปรียบเทียบการขยายตัวของหลอดเลือด pial microvessels หลังการให้ยา nitroglycerin ที่เวลา 5, 15, 30 และ 60 นาที และคำนวณเป็นร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก (% of control) ผลการศึกษาพบว่าหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 10 micrometer ซึ่งจัดเป็นหลอดเลือด capillary มีการขยายตัวมากกว่าหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 micrometer ในทุกช่วงของการวัด (P value < 0.001, ANOVA for repeated measurement) แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงเป็น mean และ 95% confidence interval ของร้อยละของเส้นผ่าศูนย์กลางขณะพัก



การศึกษาที่ 2

ศึกษาผลของ nitric oxide ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดสมอง

กลไกการศึกษาผลของ nitric oxide ต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือดสมอง โดยศึกษาในโครงสร้างระดับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ทั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับอวัยวะของเซลล์ต่างๆ โดยผลทางอ้อมของไนโตรกลีเซอรีน ในการศึกษานี้ใช้ nitroglycerin (nitroglycerin) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น nitric oxide เมื่อให้เข้าสู่ร่างกาย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ศึกษาโดยใช้หนูพันธุ์ Wistar ไม่จำกัดเพศ น้ำหนักระหว่าง 300-350 กรัม นำมาทำให้สลบโดยใช้ pentobarbital ขนาด 25 มิลลิกรัมน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากสัตว์ทดลองสลบ ทำการผ่าตัดบริเวณใกล้ขาหลังขนาดใหญ่หลอดเลือดฟีมอราล สอดท่อเข้าในหลอดเลือดดำฟีมอราลเพื่อใช้ในการให้ยา และสอดท่อเข้าในหลอดเลือดแดงฟีมอราลเพื่อใช้ในวัดความดันเลือดโดยต่อเข้ากับ physiograph (Nihon-Koden, Japan)

เริ่มทำการศึกษาโดยฉีด nitroglycerin ในขนาด 1 มิลลิกรัมน้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าทางหลอดเลือดดำโดยใช้เครื่อง infusion pump โดยให้ยาทั้งหมดภายใน 5 นาที 2 ชั่วโมงหลังจาก nitroglycerin infusion เตรียมกรรมวิธี perfusion โดยทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลองตั้งแต่ระดับช่องท้องจนถึงหัวใจ เจาะให้เห็นแขนผ่านตั้งแต่ส่วนยอด (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 แยกส่วนกะโหลกศีรษะออก ตัดแยกเนื้อสมองจากส่วนสมองใหญ่ (cerebral cortex) โดยแบ่งเป็นชิ้นเนื้อรูปลูกบาศก์มีความยาวด้านละ 1 มิลลิเมตร นำเนื้อสมองที่แยกได้มาเตรียมเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน สำหรับในกลุ่มควบคุมใช้ normal saline ฉีดแทนยา nitroglycerin ในการศึกษาขั้นต้นนี้ใช้กลุ่มทดลอง 5 ตัวและกลุ่มควบคุม 3 ตัว

การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

เตรียมชิ้นเนื้อสมองและหลอดเลือดที่ต้องการศึกษาให้อยู่สภาพที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope) และอิเลคตรอนส่องกวาด (scanning electron microscope) โดยผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ทำการ fix เนื้อเยื่อโดยแช่ชิ้นเนื้อใน 3% glutaraldehyde ในสารละลาย cacodylate buffer
2. หลังจากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย sucrose ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที
3. แล้วนำมา fix ซ้ำโดยแช่ในสารละลาย 1% osmic acid
4. ทำให้เนื้อเยื่อปราศจากน้ำ (dehydrate) โดยผ่าน alcohol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ
5. นำชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากน้ำแล้วมาฝัง (embedded) อะไรในแท่งพลาสติก (epoxy resin)
6. นำเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกเรซินมาเตรียมเป็น ultrathin section ซึ่งมีความหนาระหว่าง 70-80 ไมโครเมตร วางเนื้อเยื่อที่ตัดได้ลงบนตะแกรงทองแดง (copper grid) ขนาด 200 mesh

7. นำเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (JEM 1210, JEOL, Japan) เปรียบเทียบลักษณะทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดระหว่างสัตว์ที่ได้รับสารที่ให้ nitric oxide และกลุ่มควบคุม

วิธีการวัดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด (Quantitative Morphometric Study)

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดฝอยในเนื้อสมอง โดยกำหนดเกณฑ์ต่างๆเพื่อใช้เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงในสัตว์ทดลองที่ได้รับ nitroglycerin และกลุ่มควบคุม ทำการวัดขนาดของหลอดเลือดและจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ หลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 10 micrometer ซึ่งหลอดเลือดดังกล่าวจัดเป็นหลอดเลือดชนิด capillary และหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 micrometer ซึ่งได้แก่หลอดเลือดขนาด arteriole parameter ที่ทำการศึกษาประกอบด้วยจำนวนของ microvilli, ขนาดของ mitochondria, จำนวนและความหนาแน่นของ pinocytic vesicle จำนวนและความหนาแน่นของ microvilli ได้จากการวัดหลอดเลือดทั้งสิ้น 50 arterioles และ 100 capillaries จากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม แสดงผลของ microvilli เป็นจำนวนต่อ 1 vessel และจำนวนและความหนาแน่นของ pinocytic vesicle เป็น vesicle per square micrometer ในส่วนของการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondria นั้น ศึกษาโดยวัดจากเส้นผ่าศูนย์กลางของ mitochondria จากภาพกำลังขยาย 51,000 เท่า ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 100 mitochondria และหาค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม ในการทดลองนี้ระบุให้ mitochondria ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า mean + 2 SD ของค่าปรกติเป็น mitochondria ที่มีการบวม (swollen)

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องผ่านพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมอง ดังนี้

3.1 การเปลี่ยนแปลงในจำนวนของ pinocytic vesicle ในภาวะปรกติ เซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดฝอยในสมองจะมีจำนวนของ pinocytic vesicle ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดในอวัยวะอื่นๆ จากการศึกษาครั้งนี้พบการเพิ่มจำนวนของ pinocytic vesicle อย่างชัดเจนในหลอดเลือดของกลุ่มที่ได้รับยา nitroglycerin โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวน pinocytic vesicle ในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร เท่ากับ 27.3±2.8 และ 9.9±2.8 vesicle/square micrometer (สำหรับกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ตามลำดับ) และค่า pinocytic vesicle ในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 ไมโครเมตร เท่ากับ 27.9±3.5 และ 9.7±1.6 vesicle/square micrometer (สำหรับกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ตามลำดับ) (ตารางที่ 2.1) การเพิ่มของ pinocytic vesicle บ่งชี้ถึงภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการซึมผ่าน ซึ่งแสดงว่าเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองสูญเสียความสามารถในการกักกั้นสารและเกิดการรั่วขึ้น

3.2 การเปลี่ยนแปลงของ mitochondria เซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองมีจำนวนของ mitochondria มากกว่าหลอดเลือดในอวัยวะอื่นๆ ซึ่งบ่งชี้ถึงการทำงานของเซลล์ที่ต้องใช้พลังงาน ในการทดลองนี้พบว่าในเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองของหนูที่ได้รับยา nitroglycerin จะพบการเปลี่ยนแปลงของ mitochondria กล่าวคือมีการโป่งพองออก (ballooning) และมีการแตกสลายของ cristae ภายใน mitochondria เมื่อ

เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ mitochondria ในเซลล์เอนโดธีเลียมของกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับยา nitroglycerin จะมีความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของ mitochondria มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 210.7±8.6 และ 157.4±20.7 nanometer ตามลำดับ สำหรับหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร และเท่ากับ 221.6±25.8 และ 170.0±20.0 nanometer สำหรับหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 ไมโครเมตร (ตารางที่ 2.2) เมื่อเปรียบเทียบรูปร่างของ mitochondria ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า mean + 2SD ของค่าปรกติ พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin มีจำนวนของ mitochondria ที่มี swelling มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (45.3 และ 4.5% สำหรับกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin และกลุ่มควบคุมตามลำดับ, odd ratio 9.63; 95% confidence interval = 3.01 to 34.13, P<0.001) (ตารางที่ 2.3)

2.3 การเพิ่มจำนวนของ microvilli ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดสมองของหนูกลุ่มที่ได้รับยา nitroglycerin จะมีการเพิ่มจำนวนของ microvilli เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีจำนวนของ microvilli ในกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุมเท่ากับ 5.6±3.3 และ 0.5±0.3 microvilli ต่อหนึ่งหลอดเลือด ตามลำดับ สำหรับหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร และเท่ากับ 9.2±3.5 และ 1.3±0.8 ต่อหนึ่งหลอดเลือด สำหรับหลอดเลือดที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 ไมโครเมตร (ตารางที่ 2.4) การเพิ่มจำนวนของ microvilli ที่พบนี้อาจบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการดูดซึมของเซลล์เอนโดธีเลียม

2.4 การรวมของ astrocytic footplate และการแยกตัวของเซลล์เอนโดธีเลียมออกจากเนื้อ basement membrane ในการศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อ basement membrane ในหลอดเลือดของหนูที่ได้รับยา nitroglycerin โดยพบด้านหนึ่งที่มีการแยกตัว (separation) ของเซลล์เอนโดธีเลียมออกจากเนื้อเยื่อที่อยู่โดยรอบ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้พบทั้งในหลอดเลือดสมองที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตรและใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร ในขณะที่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวน้อยมากในหลอดเลือดสมองของกลุ่มควบคุม จากการสุ่มนับหลอดเลือด arteriole จำนวน 100 หลอดเลือดพบว่า กลุ่มควบคุมมีหลอดเลือดที่มี partial separation จำนวน 2 หลอดเลือด ในขณะที่กลุ่มที่ได้ nitroglycerin มีหลอดเลือดที่มีลักษณะดังกล่าว 29 หลอดเลือด (odd ratio = 22.15, 95% confidence interval = 4.50 to 47.64, P < 0.001) สำหรับการเปลี่ยนแปลงที่พบในหลอดเลือด capillary พบว่ามีหลอดเลือดที่มี partial separation ในกลุ่มควบคุมทั้งสิ้น 2 ใน 100 หลอดเลือด และในกลุ่ม nitroglycerin 24 ใน 100 หลอดเลือด (odd ratio = 20.01, 95% confidence interval = 4.43 = 125.54, P < 0.001) การแยกตัวของเซลล์เอนโดธีเลียม เป็นลักษณะที่พบได้ในเซลล์เอนโดธีเลียมที่กำลังเสื่อมสลายชนิด apoptotic death (ดูรายละเอียดในตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณของ pinocytic vesicle ในกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin และกลุ่มควบคุม ปริมาณของ pinocytic vesicle เฉลี่ยจากหลอดเลือด 5 หลอดเลือดต่อหนู 1 ตัว โดยแยกศึกษาในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า และน้อยกว่า 10 μm และรายงานเป็นความหนาแน่นของ pinocytic vesicle/square micrometer (μm²)

PINOCYTIC VESICLE (number/?m²)	
CONTROL	NITROGLYCERIN
Vessels with diameter less than 10 micrometer	
14.6	29.6
8.4	25.6
10.2	24.4
8.4	30.8
8.0	26.0
9.9 (2.8)	27.3 (2.8)
Vessels with diameter greater than 10 micrometer	
9.2	25.6
9.2	29.6
11.6	29.4
10.8	25.4
7.6	34.0
9.7 (1.6)	28.9 (3.5)

ตารางที่ 2.2 แสดงขนาดของ mitochondria ในหลอดเลือดสมองของหนูที่ได้รับ nitroglycerin และกลุ่มควบคุม โดยแยกศึกษาในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า และน้อยกว่า 10 μm และรายงานเป็นความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางมีหน่วยเป็นนาโนเมตร

MITOCHONDRIA DIAMETER (nm)	
CONTROL	NITROGLYCERIN
Vessels with diameter less than 10 micrometer	
139.9	208.1
149.5	199.8
166.1	223.6
189.6	211.5
142.0	210.2
157.4 (20.7)	210 (8.6)
Vessels with diameter greater than 10 micrometer	
150.1	224.1
151.1	197.1
187.2	260.9
194.0	199.8
167.8	226.1
170.0 (20.2)	221.6 (26.8)

ตารางที่ 2.3 แสดงจำนวนของ mitochondria ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า mean + 2SD ของค่าปรกติในหลอดเลือดสมองของหนูที่ได้รับ nitroglycerin และกลุ่มควบคุม โดยแยกศึกษาในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า และน้อยกว่า 10 Cm และรายงานเป็นจำนวนของ mitochondria ที่มีขนาดผิดปรกติ (a) หลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 micrometer และ (b) หลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 micrometer

(a)

Group	Normal mitochondria	Swollen mitochondria	Total count
Control	67	22	89
NTG	27	66	93
Total	94	88	182

Odd ratio = 7.44 (95% confidence interval = 3.67 to 15.22, P < 0.001)

(b)

Group	Normal mitochondria	Swollen mitochondria	Total count
Control	86	9	95
NTG	42	43	85
Total	128	52	180

Odd ratio = 9.78 (95% confidence interval = 4.11 to 23.91, P < 0.001)

ตารางที่ 2.4 แสดงการเพิ่มขึ้นของ microvilli ในหลอดเลือดดำของหนูที่ได้รับ nitroglycerin และกลุ่มควบคุม โดยแยกศึกษาในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า และน้อยกว่า 10 μm และรายงานเป็นจำนวนของ microvilli ต่อหนึ่งหลอดเลือด (เฉลี่ยจาก 10 หลอดเลือด/สัตว์ทดลอง 1 ตัว)

Number of Pinocytic Vesicle (number/vessel)	
CONTROL	NITROGLYCERIN
Vessels with diameter less than 10 micrometer	
0.00	5.70
0.95	5.10
0.40	4.60
0.65	1.90
0.50	11.00
0.50±0.35	5.66±3.23
Vessels with diameter greater than 10 micrometer	
0.00	5.50
2.40	12.50
1.40	7.10
1.40	7.30
1.20	13.40
1.28±0.86	9.16±3.54

ตารางที่ 2.5 แสดงจำนวนของหลอดเลือดที่มีการลอกตัวของเซลล์เอนโดธีเลียมออกจากชั้น basement membrane ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงการเสื่อมสลายของเซลล์เอนโดธีเลียม (apoptotic death) โดยแยกศึกษาในหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า และน้อยกว่า 10 micrometer และรายงานเป็นจำนวนของเซลล์เอนโดธีเลียมที่มีการลอกตัวต่อหลอดเลือด 10 หลอดเลือด (a) หลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 10 micrometer และ (b) หลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 micrometer

(a)

Group	Normal vessel	Vessel with separation	Total count
Control	2	98	100
NTG	29	71	100
Total	31	169	200

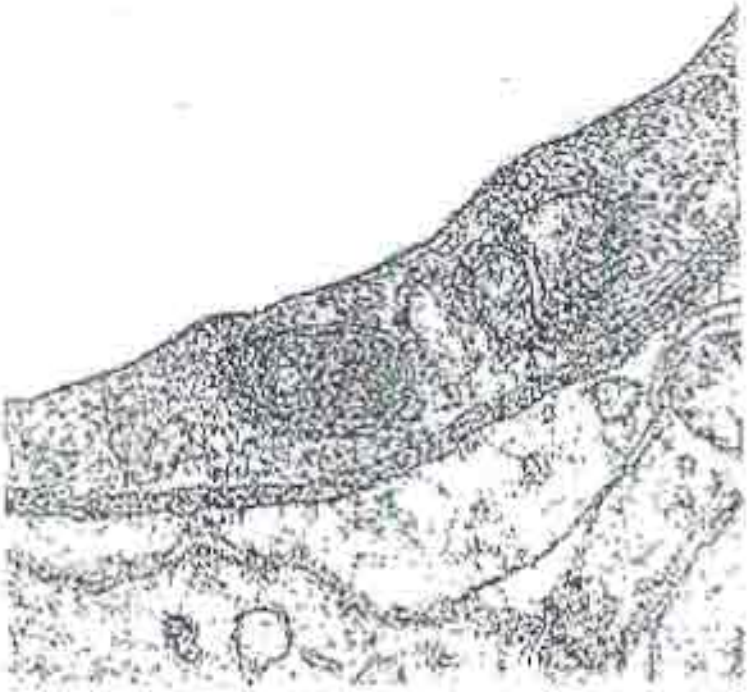
Odd ratio = 22.15 (95% confidence interval = 4.50 to 47.64, P < 0.001)

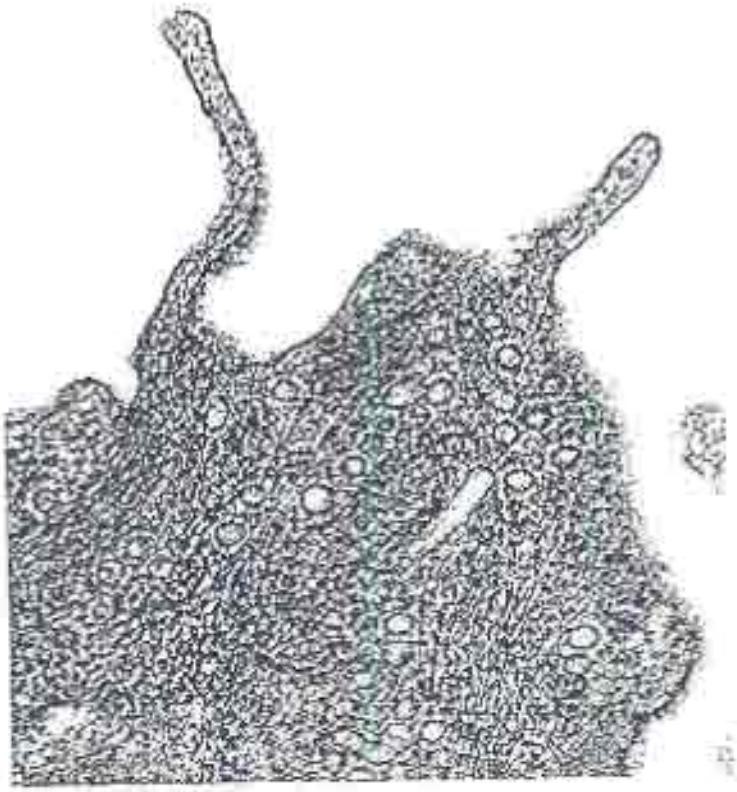
(b)

Group	Normal vessel	Vessel with separation	Total count
Control	2	48	50
NTG	24	26	50
Total	26	74	100

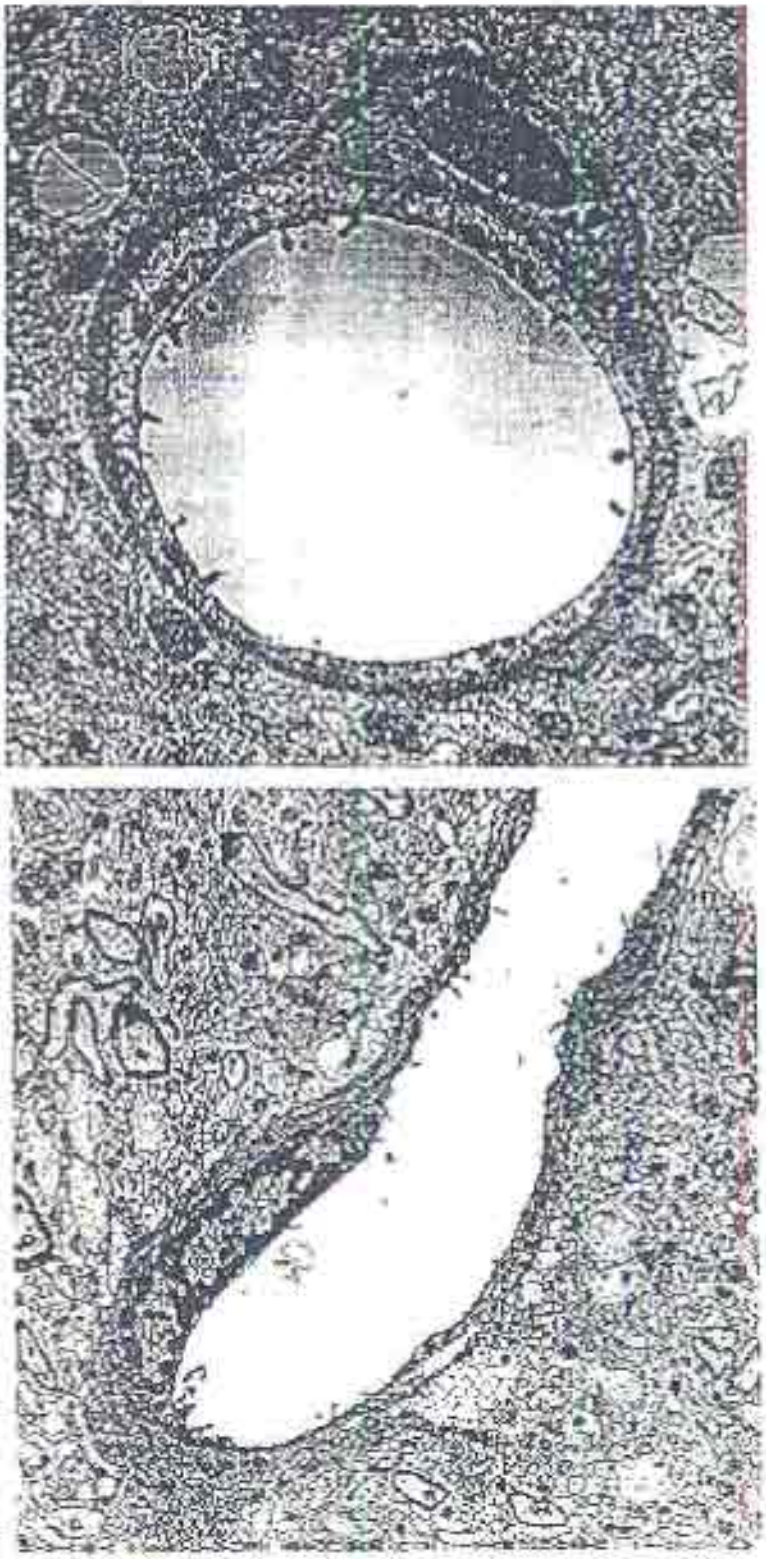
Odd ratio = 20.01 (95% confidence interval = 4.43 to 125.54, P < 0.001)

ภาพที่ 2.1 ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบ โครงสร้างของเซลล์เอนโดธีเลียมในหลอดเลือดปรกติ (ภาพบน) และหลอดเลือดในสัตว์ที่ได้ nitroglycerin (ภาพล่าง) ในภาพแสดงการเพิ่มจำนวนของ pinocytic vesicle ในเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดแดงของหนูที่ได้ nitroglycerin

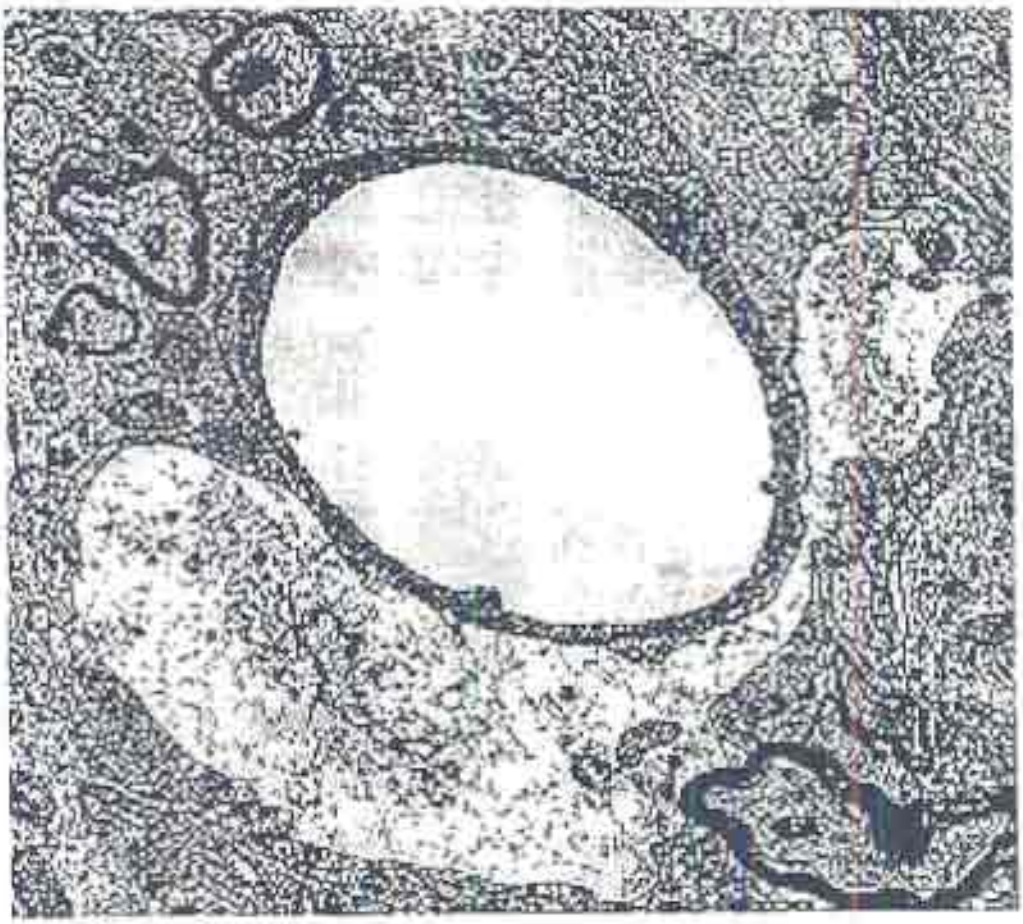




ภาพที่ 2.2 ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงการเพิ่มจำนวนของ microvilli ในเซลล์เยื่อโครีเลียมของทอลคเลือดสมองของหนูที่ได้ mucoglycoprotein



ภาพที่ 2.3 ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง astrocytic footplate (FP) swelling และ การแยกตัว (separation) ของเซลล์เอนโดธีเลียมออกจากเยื่อ basement membrane ในหลอดเลือดสมองของหนูที่ให้ nitroglycerin



การศึกษาที่ 3.

ผลของ nitric oxide ต่อการกระตุ้นระบบรับความเจ็บปวด จากหลอดเลือดสมองโดยวัดจำนวน noxious stimulation-evoked Fos expression

3.1 การพัฒนาเทคนิคสำหรับศึกษา Fos immunoreactivity

ในการศึกษานี้เริ่มจากการพัฒนาเทคนิคสำหรับการย้อม Fos ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามการทำงาน (activity dependent) ของเซลล์ประสาท โดยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ model ในสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดยใช้สารเคมี (chemical-induced inflammation) และศึกษาการกระจายของ Fos immunoreactive cell ในบริเวณ dorsal horn ของไขสันหลัง

วิธีการศึกษา

การทดลองนี้ใช้หนูพันธุ์ Wister ไม่จำกัดเพศ กระตุ้นให้เกิด chemical inflammation ด้วยวิธี formalin test โดยสอบสัตว์ทดลองด้วย ether inhalation จากนั้นฉีด 5% formalin ปริมาตร 100 microliter เข้าใต้อุ้งเท้าสัตว์ทดลอง formalin จะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นตัวรับ nociceptor หลังจากนั้น 2 ชั่วโมง จึง sacrifice สัตว์ทดลองด้วย pentobarbital ขนาดสูง และทำการเจริญ perfusion เพื่อศึกษาทางด้าน immunohistochemistry ต่อไป โดยทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลองตั้งแต่ระดับช่องท้องขึ้นถึงหัวใจ เจาะให้เข็มแทงผ่านตั้งแต่ส่วนปลาย (apex) ของหัวใจผ่านหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และสอดท่อยางที่ต่อเข้ากับเครื่อง perfusion ทำการ perfuse ด้วย phosphate buffer saline (PBS: pH 7.4) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และตามด้วยกระบวนการ fixative ซึ่งใช้ 4% paraformaldehyde (pH 7.4) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองแข็ง จากนั้นทำการตัดแยกไขสันหลังส่วนคอ (cervical spinal cord) นำชิ้นเนื้อที่ได้มาทำการ postfixation โดยแช่ใน 0.1 M PBS เก็บไว้ข้างต้นในอุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจึงนำมาแช่ใน 30% sucrose in 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4 °C) แช่นานจนกระทั่งชิ้นเนื้อจมลงใน buffer เพื่อ cryoprotection เมื่อชิ้นเนื้อจมลงแล้วจึงนำมาตัดโดยใช้เครื่อง cryostat (Microm HM 50 N) ในแนว axial plane โดยตั้งความหนาของ slide ที่ 30 microcoter เก็บชิ้นเนื้อที่ตัดได้ไว้ใน 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4 °C) เพื่อเตรียมการต่อด้วย immunohistochemistry

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 c-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

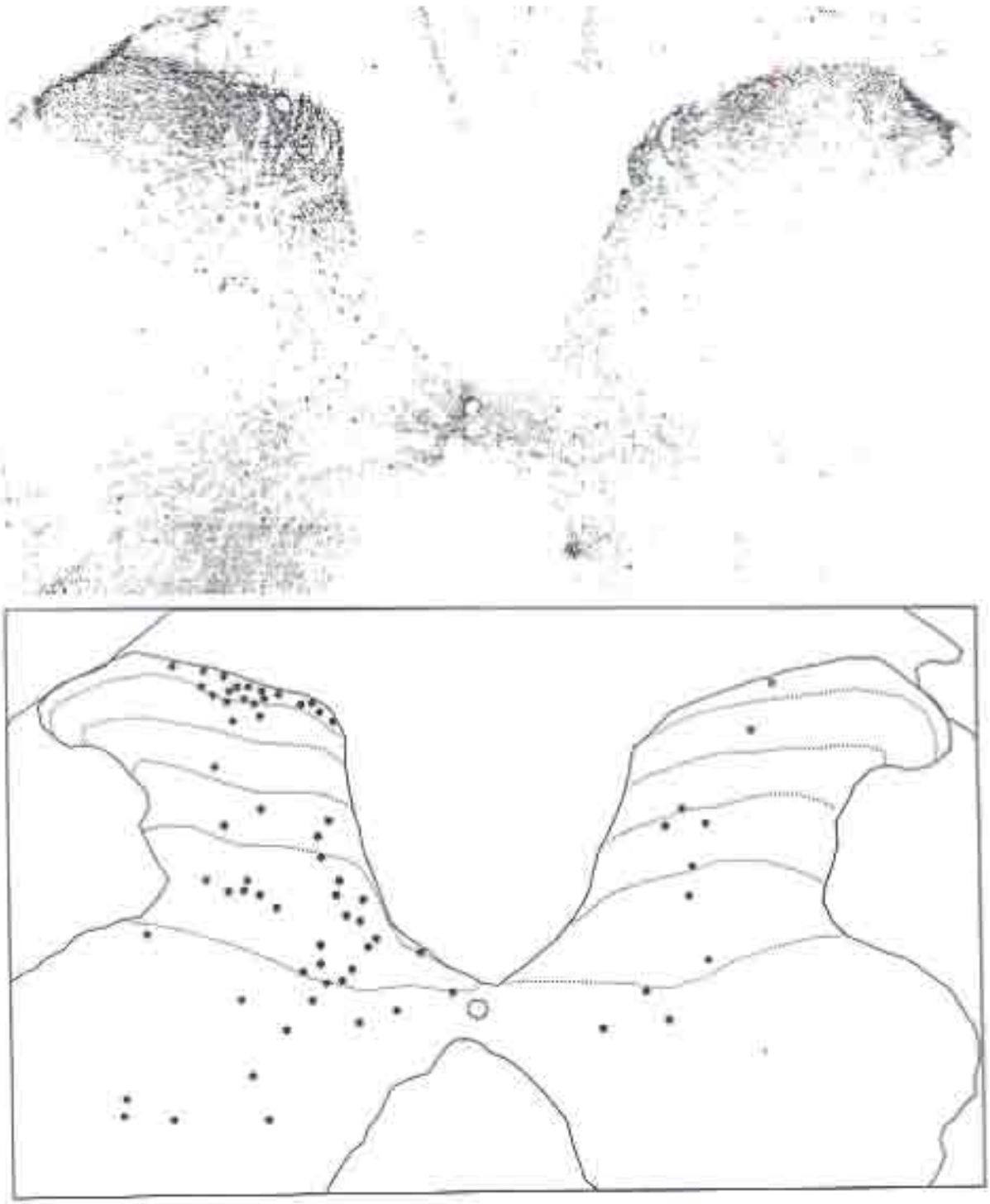
การนับเซลล์ที่มี Fos-like immunoreactivity

นำ slide ที่ได้มาดูโดยใช้ light microscope เซลล์ที่มี Fos-like immunoreactivity (FLI) จะติดสีน้ำตาลเข้ม (dark brown) ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของกลุ่มเซลล์ประสาทที่มี FLI และทำการนับจำนวนเซลล์ดังกล่าว โดยศึกษาใน Rex's laminae I, II และ V รายงานผลเป็น จำนวนเซลล์ต่อ section

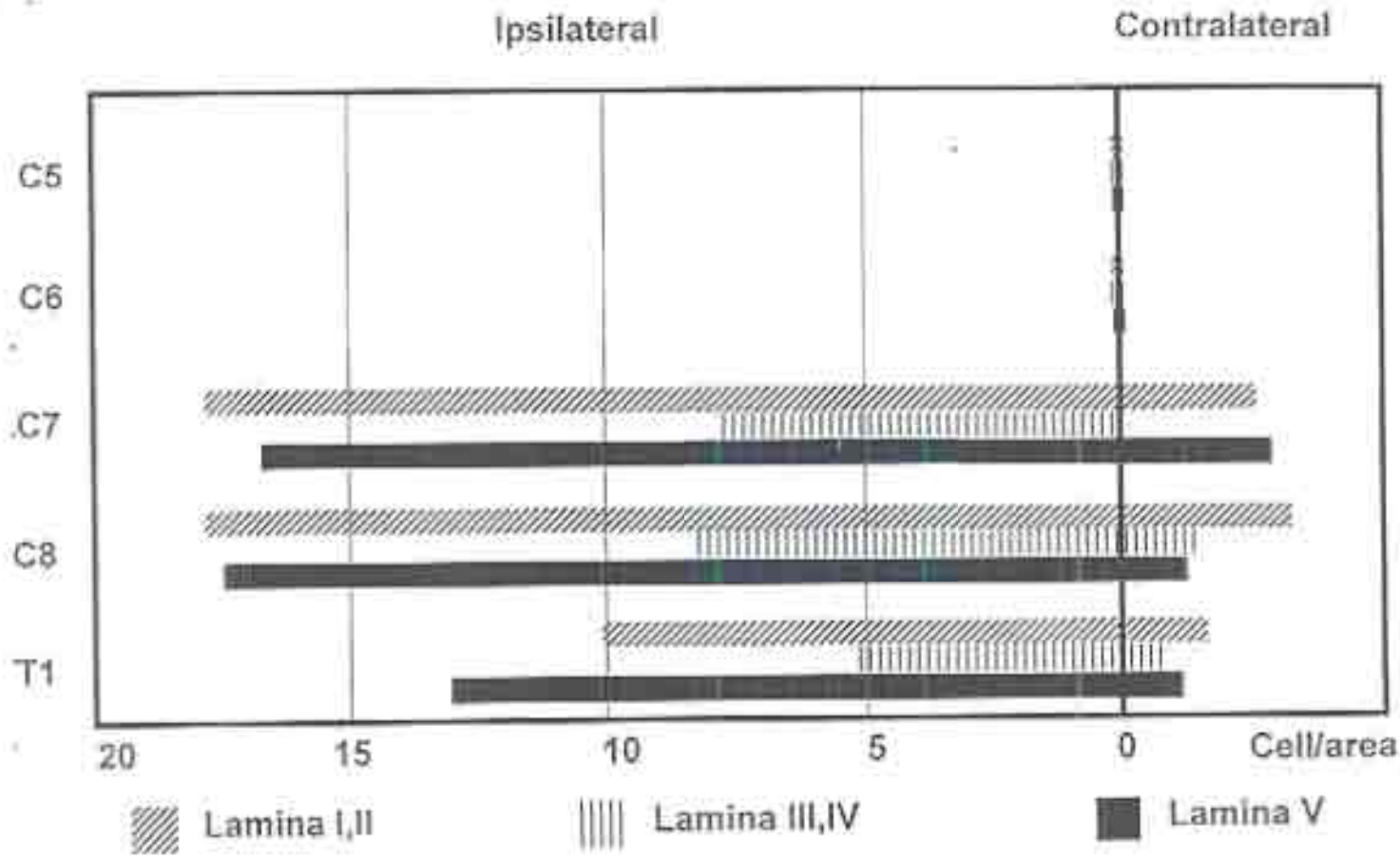
ผลการศึกษา

ผลการศึกษาพบว่า การยืดสาที่กระตุ้นโดยการฉีด formalin เข้าใต้อุ้งเท้าสัตว์ทดลอง สามารถกระตุ้นให้เกิด Fos expression ขึ้นในเซลล์ประสาทใน dorsal horn ของไขสันหลัง โดยพบในด้านเดียวกัน (ipsilateral) กับเท้าที่เกิดการยืดสา laminae ที่พบ Fos-like immunoreactivity มาก ได้แก่ laminae I, II และ V (ภาพที่ 3.1-3.2) ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ pain processing โดย laminae ดังกล่าวเป็นตำแหน่งของเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดข้อมูลเกี่ยวกับความปวดไปยัง thalamus (thalamic projection neuron) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า FLI สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการทำงานของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับระบบรับความเจ็บปวดได้

ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะของ noxious stimulation-evoked c-fos immunoreactivity ใน dorsal horn ของไขสันหลัง ซึ่งพบว่า laminae ที่พบ fos-like immunoreactivity มาก ได้แก่ laminae I, II และ V ซึ่งเป็นตำแหน่งของเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่เป็น thalamic projection neuron โดยจะพบในด้านเดียวกับด้านที่ได้รับการกระตุ้น



ภาพที่ 3.2 แสดงจำนวนของ noxious stimulation-evoked c-fos immunoreactivity ใน dorsal horn ของไขสันหลัง laminae ที่พบ fos-like immunoreactivity มาก ได้แก่ laminae I, II และ V



3.2 การศึกษาผลของ nitric oxide ในการกระตุ้นให้เกิด Fos expression ในเซลล์ประสาทกลุ่มต่างๆในก้านสมองและสมองส่วน diencephalon

เป็นการศึกษาผลของ nitric oxide ในการกระตุ้นเซลล์ประสาทในก้านสมอง โดยอาศัยลักษณะการแสดงออกของโปรตีน Fos ซึ่งศึกษาโดยการย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry วิธี Avidin Biotin Method

วิธีการศึกษา

การทดลองนี้ใช้หนูพันธุ์ Wister ไม่จำกัดเพศ แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 5 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ซึ่งเป็น nitric oxide donor และกลุ่มควบคุม ในกลุ่ม NO ให้ nitroglycerin ในขนาด 10 mg/kg b.w เข้าทางหลอดเลือดดำ โดยใช้เครื่อง infusion pump โดยให้ยาทั้งหมดภายใน 5 นาที 2 ชั่วโมงหลังจาก nitroglycerin infusion เตรียมกรรมวิธี perfusion โดยทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลองตั้งแต่ระดับช่องท้องจนถึงหัวใจ เจาะให้เข็มเดินผ่านตั้งแต่ส่วนยอด (apex) ของหัวใจผ่านหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และสอดท่อยางที่ต่อเข้ากับเครื่อง perfusion ทำการ perfuse ด้วย phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และตามด้วยกระบวนการ fixative ซึ่งใช้ 4% paraformaldehyde (pH 7.4) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองแข็ง จากนั้นนำมาผ่าตัดเปิดกะโหลกศีรษะ แยกฝากะโหลกออกด้วยกรรไกร ตัดแยกสมองและไขสันหลังส่วนคอ (cervical spinal cord) นำชิ้นเนื้อที่ได้มาทำการ post fixation โดยแช่ใน 0.1 M PBS เก็บไว้ข้ามคืนในอุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจึงนำมาแช่ใน 30% sucrose in 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4 °C) เพื่อนานจนกระทั่งชิ้นเนื้อจมลงใน buffer เพื่อ cryoprotection เมื่อชิ้นเนื้อจมลงแล้วจึงนำมาตัดโดยใช้เครื่อง cryostat (Microm HM 50 N) โดยตัดในแนว coronal plane สำหรับส่วนสมอง และ axial plane สำหรับส่วนไขสันหลัง โดยตั้งความหนาของ slide ที่ 10 μm เก็บชิ้นเนื้อที่ตัดได้ไว้ใน 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4 °C) เพื่อเตรียมการย้อมด้วย immunohistochemistry สำหรับในกลุ่มควบคุมใช้ normal saline ฉีดแทนยา nitroglycerin

วิธี Immunohistochemistry Method

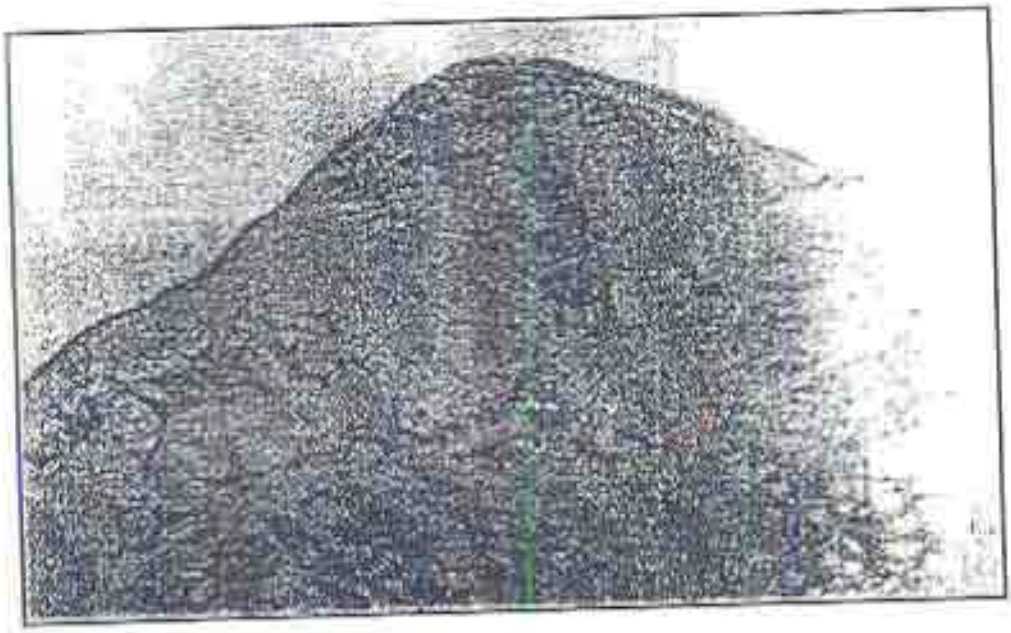
ในการศึกษานี้ใช้วิธี free floating method โดยนำชิ้นเนื้อที่ตัดได้มาล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วนำมาแช่ใน PBS ที่เติม 1% hydrogen peroxide (เป็นเวลา) 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อลด endogenous peroxidase จากนั้นนำชิ้นเนื้อมา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS + 1% BSA + 0.3% Triton 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 c-Fos like immunoreactivity (FLI) จะติดสีน้ำตาลเข้ม (dark brown) ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของกลุ่มเซลล์ประสาทที่มี FLI และทำการนับจำนวนเซลล์ดังกล่าว

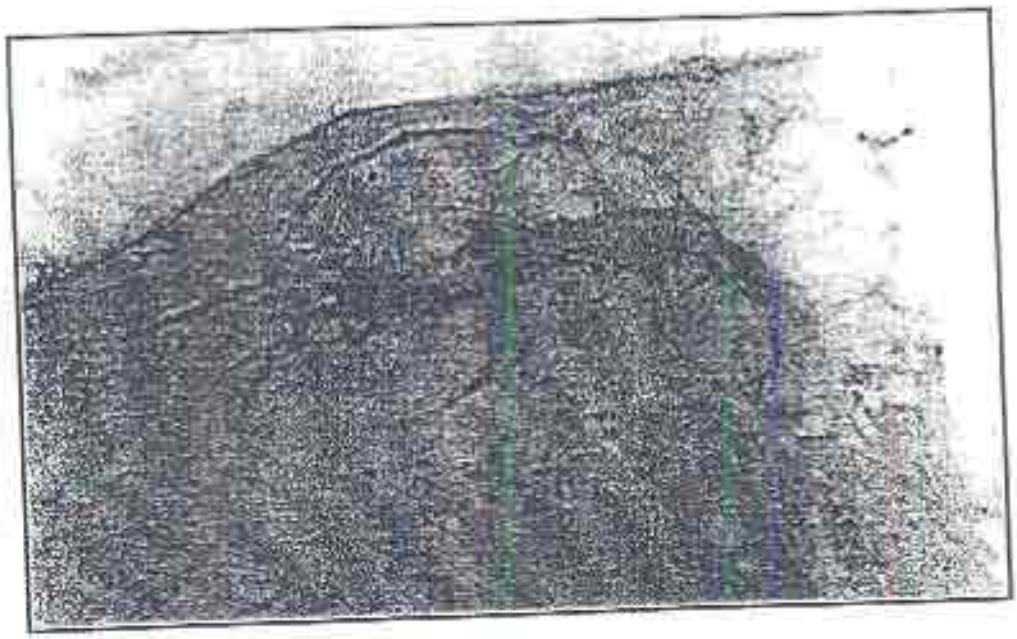
ผลการศึกษา

ในกลุ่มควบคุมจะพบเซลล์ที่มี FLI จำนวนน้อยมากโดยพบกระจัดกระจายในส่วนของก้านสมอง สำหรับในสัตว์ทดลองที่ได้ nitroglycerin จะพบ FLI ในกลุ่มเซลล์ประสาทต่างๆทั้งในระดับ lower brainstem, epithalamus และ hypothalamus ในระดับก้านสมองพาเซลล์ที่ติดสี FLI ในกลุ่มเซลล์ nucleus of tractus solitarius (NTS), nucleus reticularis lateralis (LRN), trigeminal nucleus caudalis (TNC) และ inferior olive (IO) ส่วนในระดับ epithalamus และ hypothalamus จะพาเซลล์ที่มี FLI อยู่ในกลุ่ม habenular, supraoptic nucleus และ paraventricular nucleus

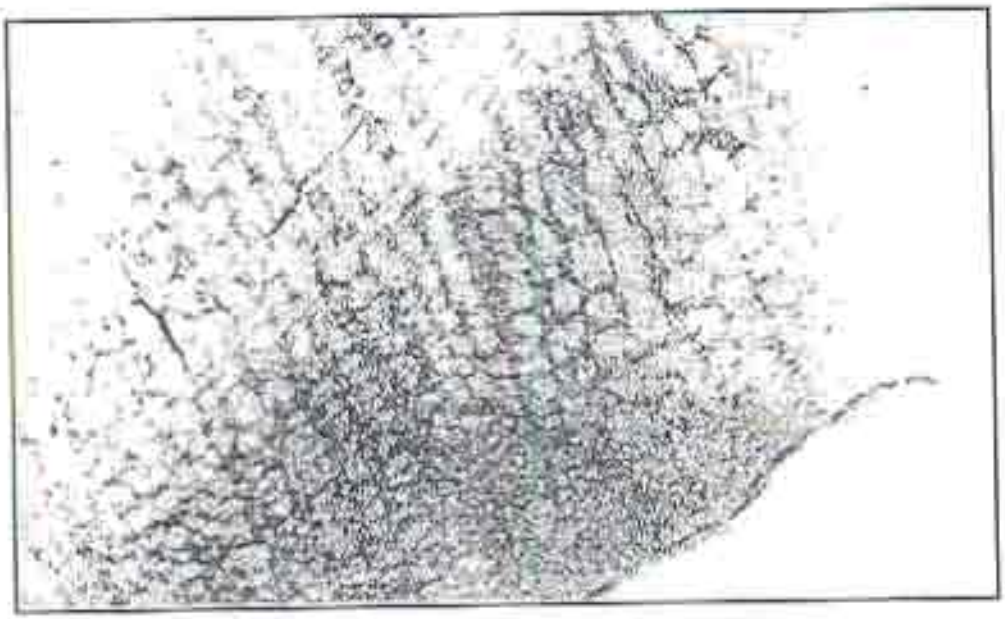
ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นด้วย nitroglycerin ซึ่งเป็น nitric oxide donor นั้นสามารถทำให้มี immediate early gene response และสร้าง transcription factor เพิ่มขึ้น อีกประเด็นที่น่าสนใจคือการพบ FLI ในกลุ่มเซลล์ trigeminal nucleus caudalis ซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ในกลุ่มเซลล์นี้ทำงานมากขึ้น

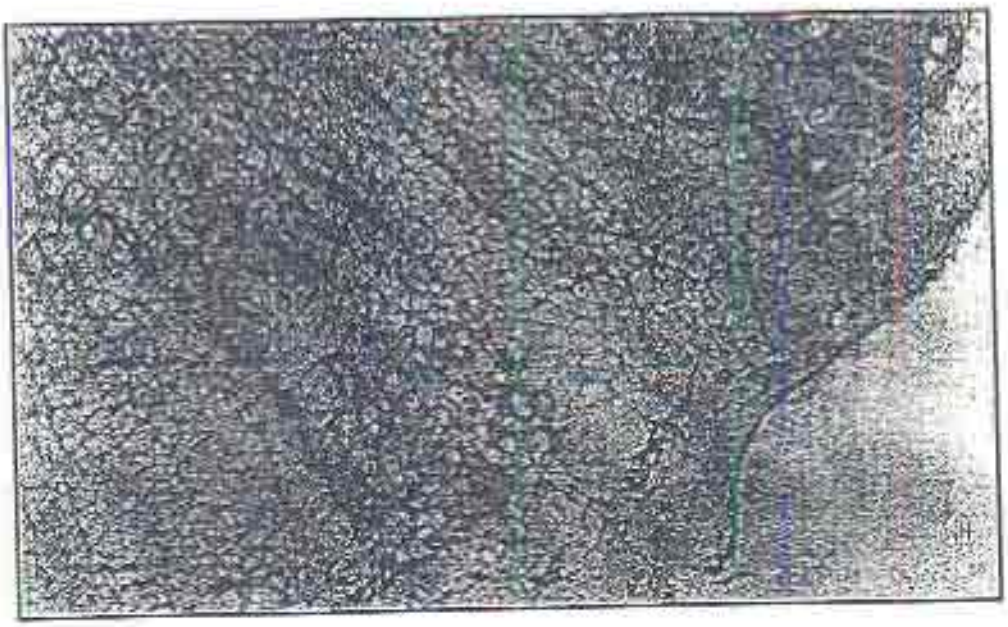
ภาพที่ 3.3 เปรียบเทียบลักษณะของ c-fos immunoreactivity (FLI) ในกลุ่มควบคุม (ภาพบน) และกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin infusion (ภาพล่าง) ในส่วนของ trigeminal nucleus caudalis ในก้านสมองระดับ medulla oblongata จากภาพจะเห็นว่าเซลล์ประสาทใน trigeminal nucleus caudalis จะมี FLI ซึ่งบ่งชี้ว่า NO สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการทำงานของ trigeminal system ซึ่งเป็นระบบที่สำคัญในการรับความรู้สึกปวดจากหลอดเลือดสมอง



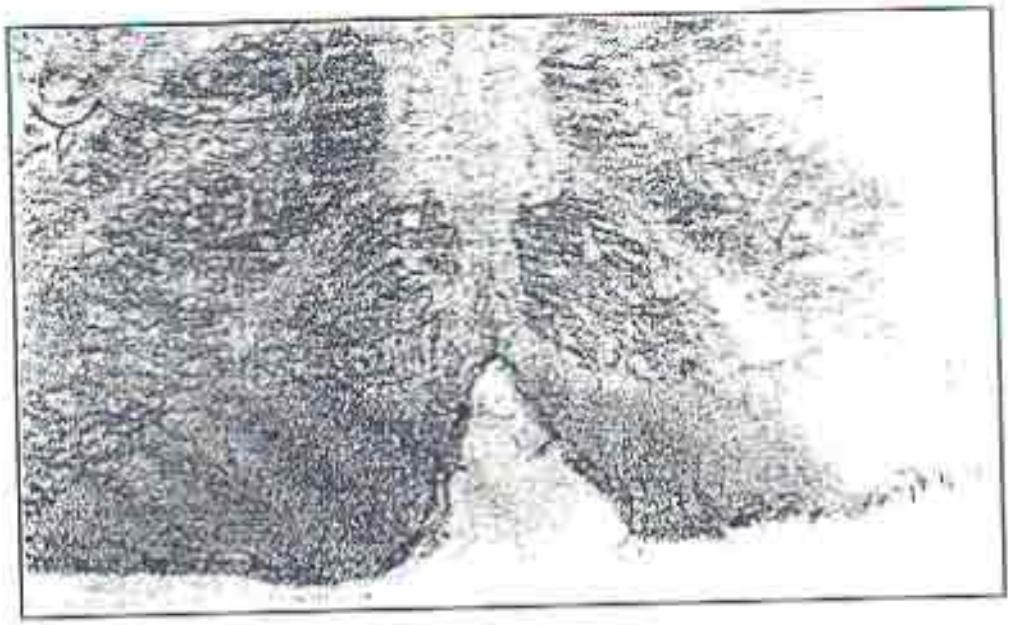


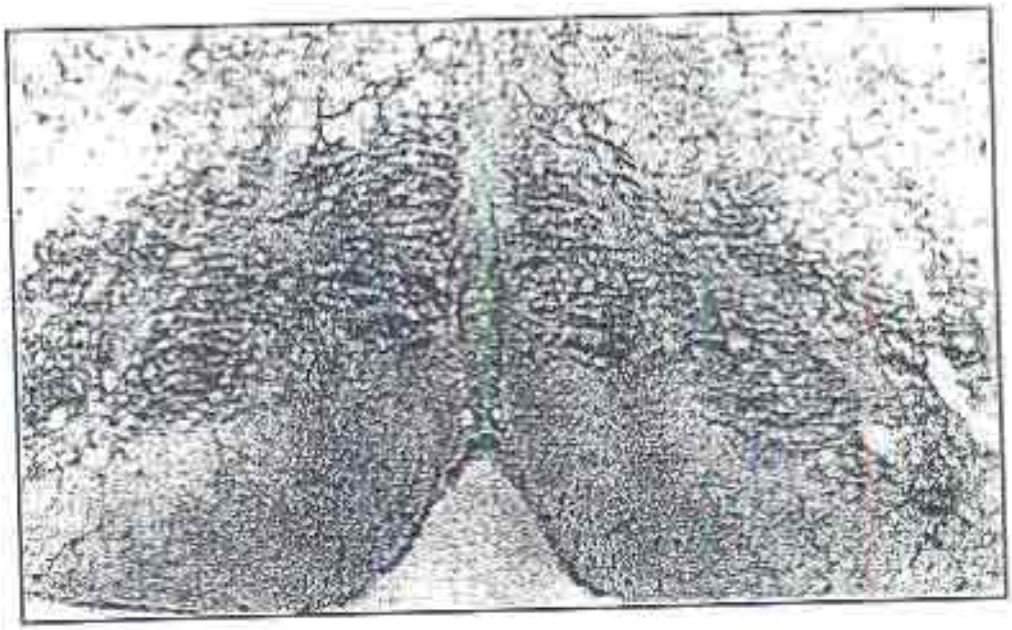
ภาพที่ 3.4 เปรียบเทียบล้อนและของ c-*fos* immunoreactivity (FLI) ในกลุ่มควบคุม (ภาพบน) และกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin infusion (ภาพล่าง) ในส่วนของ lateral reticular formation (nucleus reticularis lateralis) ในก้านสมองระดับ medulla oblongata ในภาพแสดง FLI cell ในกลุ่มหลังนี้ในสัตว์ทดลองที่ได้รับ NO donating agent ซึ่งแสดงว่า NO สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการทำงานของ lateral reticular formation ซึ่งเป็นนิวเคลียสที่ทำหน้าที่สำคัญในการปรับความรู้สึกปวด (pain modulation)





ภาพที่ 3.5 เปรียบเทียบลักษณะของ c-fos immunoreactivity (FLI) ในกลุ่มควบคุม (ภาพบน) และกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin infusion (ภาพล่าง) ในส่วนของ inferior olive ในก้านสมองระดับ medulla oblongata ในภาพแสดง FLI cell ในกลุ่มเซลล์นี้ในสัตว์ทดลองที่ได้รับ NO donating agent





การศึกษาที่ 4.

การศึกษาผลของการลดลงของ serotonin ต่อการควบคุมการไหลของหลอดเลือดชั้นเพียงของเยื่อหุ้มสมองต่อ nitric oxide โดยใช้เทคนิค intravital fluorescent video-microscope monitoring

เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนเลือดในสันเลือดฝอยบริเวณผิวสมอง โดยวิธี intravital fluorescent video-microscope monitoring การติดฉลากสารโมเลกุลใหญ่ เช่น dextran หรือเซลล์เม็ดเลือดด้วยสารฟลูออเรสซนต์ และศึกษาการไหลของเลือดในสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่

วิธีการศึกษา

การทดลองนี้ใช้หนูพันธุ์ Wister ไม่จำกัดเพศ แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 5 ตัว ได้แก่ กลุ่ม hyposerotonin และกลุ่มควบคุม เตรียมให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะ hyposerotonin โดยฉีด para-chlorophenylalanine (PCPA) ซึ่งมีฤทธิ์เป็น tryptophan hydroxylase inhibitor ขนาด 300 mg/kg b.w เข้าช่องท้อง จากนั้นเลี้ยงสัตว์ทดลองต่อนาน 5 วัน เพื่อให้สารสื่อประสาท serotonin ที่มีอยู่ถูกใช้ให้หมดไป จากนั้นจึงเตรียมการทดลองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองของ pial microvessel ต่อสารที่เป็น nitric oxide donor สำหรับในกลุ่มทดลองฉีด normal saline ในปริมาตรเท่ากัน

เมื่อครบกำหนด 5 วันหลังจากให้ PCPA นำสัตว์ทดลองมาทำให้สลบโดยใช้ pentobarbital ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากสัตว์ทดลองสลบแล้ว ทำการเจาะคอและใส่ท่อช่วยหายใจ (tracheostomy) จากนั้นควบคุมการหายใจของสัตว์ทดลองโดยใช้เครื่องช่วยหายใจสำหรับสัตว์ (Rodent ventilator model 683, Harvard Apparatus, USA) เปิดแผลผ่าตัดบริเวณโคนขาเพื่อสวนท่อเข้าในหลอดเลือดดำฟีเมอราล เพื่อใช้ในการให้ยา และสวนท่อในหลอดเลือดแดงฟีเมอราลเพื่อใช้เก็บตัวอย่างเลือดสำหรับวิเคราะห์และควบคุมเป็นกรด-ด่างของเลือด (blood gas analysis) หลังจากนั้นทำการผ่าตัดเปิดกะโหลกศีรษะ (craniectomy) บริเวณกะโหลกศีรษะออก วางช่องหน้าต่าง (window) ที่สร้างจากโลหะปลอดสนิม (stainless steel) มีรูปร่างเป็นวงแหวน มีแท่นฝาครอบอยู่ภายใน 7 มิลลิเมตร เชื่อมวงแหวนหน้าต่างกับกะโหลกศีรษะให้สนิท หล่อเลี้ยงเนื้อสมองที่เปิดออกโดยผ่านน้ำไขสันหลังเทียม (artificial cerebrospinal fluid) เข้าในช่องหน้าต่าง ศึกษาขนาดและอัตราเร็วในการไหลของเลือดในหลอดเลือดชั้นเยื่อหุ้มสมองโดยวิธี fluorescence video-microscope monitoring ระหว่างการศึกษาบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ และความดันเลือดโดยเครื่อง polygraph (6000-M polygraph, Nihon Kohden)

การให้ยาที่เป็น Nitric oxide donor

เริ่มทำการศึกษาโดยฉีด nitroglycerin ในขนาด 0 หรือ 10 mg/kg b.w. เข้าทางหลอดเลือดดำ femoral โดยใช้เครื่อง infusion pump และควบคุมอัตราการฉีดให้สัตว์ทดลองได้ยาทั้งหมดภายใน 5 นาที

วิธี intravital fluorescent video-microscope monitoring

ทำการศึกษาโดยใช้สารที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสซนต์ ซึ่งได้แก่ FITC-dextran เป็นสารฟลูออเรสซนต์ที่ติดกับ dextran มีน้ำหนักโมเลกุล 150,000 เนื่องจากสารนี้มีขนาดใหญ่ในภาวะปรกติจะไม่มีการรั่วออกสู่ภายนอก ยกเว้นในกรณีที่มีการรั่วของ blood-brain barrier หลังจากให้สารฟลูออเรสซนต์แล้ว ศึกษาลักษณะของหลอดเลือดในสมองผ่านบริเวณช่องหน้าต่างที่เตรียมไว้ ด้วยกล้องฟลูออเรสซนต์ (Nikon-Optiphot 2) บันทึกภาพของหลอดเลือดด้วยกล้องบันทึกวีดีทัศน์ (SIT Camera, DAGE) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยโปรแกรม

คอมพิวเตอร์ Global Lab Image Software คัดเลือกหลอดเลือดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางในภาวะพักระหว่าง 10-30 μm ซึ่งจัดเป็นหลอดเลือดชนิด arteriole โดยเลือกหลอดเลือดจำนวน 30 เส้นจากสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม

Statistical Analysis

แสดงผลของตัวที่วัดได้เป็น mean±SE และ 95% confidence interval เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในเวลาต่างๆ โดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) for repeated measurement กำหนดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ type I error < 5% หรือ ค่า P < 0.05

ผลการศึกษา

การให้ยา nitroglycerin ซึ่งเป็น vasodilating agent ทำให้เกิดการลดลงของความดันเลือด (systemic blood pressure) โดยค่าเฉลี่ยของ mean arterial pressure ที่เวลา 0, 5, 15, 30 และ 60 นาทีหลังให้ยาเท่ากับ 108.3±10.4, 96.0±4.9, 101.7±4.7, 103.3±4.7 และ 103.3±4.7 mmHg ตามลำดับ ค่าความต่างของ mean arterial pressure ระหว่างเวลาที่ 0 และ 5 นาที เท่ากับ 12.3±7.2 mmHg (95% confidence interval = 3.4 to 21.3, P = 0.019) หลังจากระดุดลงแล้วความดันเลือดแดงกลับขึ้นมาอยู่ในระดับปรกติ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ pH, PaO_2 หรือ $PaCO_2$ ตลอดการศึกษา ในการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของระดับความดันโลหิตในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ PCPA pretreatment

เมื่อศึกษาผลของ nitroglycerin ต่อหลอดเลือดพบว่า สารที่มีฤทธิ์เป็น nitric oxide donor สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กในชั้น pia โดยการขยายตัวของหลอดเลือด (vascular dilation) เกิดขึ้นมากที่สุดที่เวลา 15 นาที และคงอยู่เป็นเวลานานกว่า 60 นาที การเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี ANOVA for repeated measurement with posthoc Bonferroni test พบว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดที่วัดที่เวลา 0, 5 และ 15 นาทีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ การขยายตัวของหลอดเลือดจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ยา nitroglycerin ขนาด 10 mg/kg b.w. สามารถทำให้หลอดเลือดมีการขยายตัวได้มากกว่าขนาด 8 mg/kg b.w. อย่างมีนัยสำคัญ โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดที่เวลา 15 นาทีหลังให้ยา nitroglycerin ขนาด 10 mg/kg เท่ากับ 57.97±6.39% ของค่าก่อนให้ยา (95%CI = 44.81 ถึง 71.03, P<0.001) และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดในกลุ่มที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 8 mg/kg เท่ากับ 23.42±2.73% (95%CI = 18.22 to 25.62, P<0.001) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการรั่วของสาร FITC-dextran ออกนอกหลอดเลือด

ผลของ PCPA-pretreatment ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ nitroglycerin ผลการศึกษาพบว่าการให้ยาเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะพร่อง serotonin ทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดต่อ NO donor เพิ่มขึ้นทั้งในขนาด (magnitude) และระยะเวลาของการตอบสนอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเวลา 30 และ 60 นาที โดยพบว่าที่เวลา 30 นาทีหลังได้รับ nitroglycerin ขนาด 10 mg/kg หลอดเลือด pial arteriole ขยายตัวคิดเป็นร้อยละ 58.51±4.91 และ 40.43±5.64 ในหนูที่ได้รับ PCPA pretreatment และกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ 18.08±6.08 %, 95%CI = 1.61 to 34.55, P=0.034) ผลของ PCPA pretreatment ยังคงเห็นชัดขึ้นเมื่อศึกษาในสัตว์ทดลองที่ได้รับ nitroglycerin ขนาด 8 mg/kg โดยพบการเปลี่ยนแปลงที่เวลา 30 นาที เท่ากับ 42.55±3.10 และ 16.77±2.89% ในหนูที่ได้รับ PCPA pretreatment และกลุ่มควบคุมตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ 25.78±6.08, 95%CI = 9.31 to 42.25, P<0.001)