



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ผลของไนตริกออกไซด์ และไนตริกออกไซด์ซินเทสอินฮิบิเตอร์ ต่อ
การปรับเปลี่ยนระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ และคณะ

ตุลาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ผลของไนตริกออกไซด์ และไนตริกออกไซด์ซินเทสอินฮิบิเตอร์ ต่อ
การปรับเปลี่ยนระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์¹
2. อาจารย์ วีระ สุพรศิลป์ชัย³
3. ศาสตราจารย์ นพ. อนันต์ ศรีเกียรติขจร²

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ภาควิชาสรีรวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ศาสตราจารย์
นายแพทย์ อนันต์ ศรีเกียรติขจร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ
ของการวิจัยมาโดยตลอด

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

คุณ เพ็ญพรรณ นวลบุญมา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาด้วย
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นอย่างดี

คุณ ปรีชา เรืองเวชวรชัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการย้อมชิ้นเนื้อ พร้อมทั้งให้
คำแนะนำที่เป็นประโยชน์

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.) และ สำนักงานคณะกรรมการ
อุดมศึกษา(สกอ.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ และคณะ

สารบัญ

	หน้า
Abstract (English)-----	1
Abstract (ไทย)-----	2
Executive summary -----	3
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง-----	5
วัตถุประสงค์-----	15
ระเบียบวิธีวิจัย และ ผลการศึกษาวิจัย-----	16
1. การศึกษาผลของการให้ nitric oxide synthase inhibitor ต่อการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของหลอดเลือดสมอง-----	18
2. การศึกษาผลของการให้ nitric oxide synthase inhibitor ต่อการเปลี่ยนแปลง activity ของ brainstem neurons -----	24
3. การศึกษาบทบาทของ NO ต่อการหลั่งของสารสื่อประสาทต่างๆ-----	31
วิจารณ์ผลการทดลอง -----	37
เอกสารอ้างอิง-----	41
ภาคผนวก-----	47
1. การนำเสนอผลงานวิจัย-----	48
2. manuscript และ reprint -----	48

Effect of NO and Nitric oxide synthase inhibitor on the modulation of the trigeminovascular nociception

le Grand SM^a, Supornsilpchai W^b and Srikiatkachorn A^c

a: Department of Pathology, b: Department of Physiology Faculty of Medicine

c: Department of Physiology Faculty of Dentistry Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

Objective – To investigate the involvement of nitric oxide in the process of trigeminovascular nociceptive facilitation induced by serotonin depletion.

Methods – Male Wistar rats were separated into the control, control with L-NAME treatment, and low serotonin with and without nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. Serotonin was depleted by administration of para-chlorophenylalanine (100 mg/kg bw) 3 days prior the experiment. Cortical spreading depression (CSD) was used to activate trigeminal nociception. N-nitro-L-arginine Methyl Ester (L-NAME) was given to the rats in the low serotonin with NOS inhibitor group after the second wave of the CSD. The ultrastructure of cerebral endothelial cells was studied using electron microscopy. The number of Fos and NOS-immunoreactive neurons in trigeminal nucleus caudalis were monitored. The co-localization of NOS and Fos and the co-localization of NOS and CGRP were studied by the double immunohistochemistry.

Results – Depletion of serotonin caused an enhancement of the trigeminovascular nociception in response to the CSD activation as indicated by the increase in the ultrastructural changes of the cerebral vessels and increase in the number of the fos-immunoreactive neurons in the TNC. These vascular changes as well as CSD-evoked Fos expression in the TNC were attenuated by the treatment with L-NAME. The numbers of pinocytotic vesicles and microvilli in arteriole were significant lower in the group receiving PCPA and L-NAME. The number of Fos-IR cells observed in TNC of low serotonin rats with and without L-NAME treatment were 19±3 and 25±1 cells/section, respectively ($p < 0.05$). Treatment with L-NAME also significantly minimized the number of NOS-immunoreactive cells in TNC (23±1 and 32±3 cells/slide for those serotonin depleted rats with and without L-NAME, respectively, $p < 0.05$). The results from the double labeling immunohistochemical studies had further demonstrated that the expression of NO was in the same area with Fos and CGRP expression.

Conclusion: Inhibition of nitric oxide production can attenuate the trigeminovascular nociception induced by serotonin depletion. Therefore, the increase in the production of nitric oxide is likely to involve in the increment of trigeminal nociception in serotonin depleted state.

Keywords- Cortical spreading depression, serotonin, ultrastructure, Fos, trigeminal nucleus caudalis, nitric oxide

ผลของไนตริกออกไซด์ และไนตริกออกไซด์ซินเทสอินฮิบิเตอร์ ต่อการปรับเปลี่ยนระบบรับความเจ็บปวดจาก

หลอดเลือดสมอง

ศุภางค์ มณีศรี เกลอกรองค์^a, วีระ สุพรศิลป์ชัย^c และ อนันต์ ศรีเกียรติจร^b

a: ภาควิชาพยาธิวิทยา b: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ c: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

วัตถุประสงค์ — เพื่อศึกษาบทบาทของ NO ต่อกระบวนการรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง จากปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ในภาวะพร่องซีโรโดนิน

วิธีศึกษาวิจัย— การศึกษาวิจัยนี้ใช้หนูพันธุ์ Wistar เพศผู้โดย แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มหนูควบคุม กลุ่มหนูควบคุมที่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor กลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินและ กลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor โดยภาวะพร่องซีโรโดนิน ถูกเหนี่ยวนำโดยการฉีดสาร para-chlorophenylalanine (PCPA) ในความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว/กิโลกรัม เข้าในช่องท้อง เป็นเวลา 3 วันก่อนจะนำไปศึกษาทดลอง และกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor จะได้รับ สาร L-NAME ในความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว/กิโลกรัม ผ่านทางหลอดเลือดหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression และเกิดคลื่นไฟฟ้าบนผิวสมอง (Depolarization shift , DC shift) แล้ว 2 คลื่นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และทำการทำการศึกษากการแสดงออกของโปรตีน Fos และ NOS ด้วยวิธี immunohistochemistry และทำการทำการศึกษากการแสดงออกร่วมของโปรตีน Fos และ NOS และแสดงออกร่วมของโปรตีนCGRP และ NOS ด้วยวิธี double immunohistochemistry.

ผลการทดลอง—การกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depressionในหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินก่อให้เกิดการกระตุ้นต่อระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองมากกว่าในหนูปกติโดยพบว่าในหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนิน มีการเปลี่ยนแปลงของ endothelial cell ของหลอดเลือดสมองในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและมีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการทดลองยังพบว่า การได้รับสาร L-NAME สามารถลดการเปลี่ยนแปลง ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ในกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินลงได้ โดยผลการศึกษาในหลอดเลือดพบว่า โดยพบว่าจำนวน microvilli และ pinocytic vesicle ในหนูกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ได้รับสาร L-NAME มีจำนวนน้อยกว่าหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ไม่ได้รับสาร L-NAME อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการทดลองยังพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos ในกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ได้รับสาร L-NAME เท่ากับ 19 ± 3 เซลล์ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ไม่ได้รับสาร L-NAME 25 ± 1 เซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การได้รับสาร L-NAME ยังสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NOS ลงจาก 32 ± 3 เซลล์ ในกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนิน เป็น 23 ± 1 เซลล์ ในกลุ่มหนูพร่องซีโรโดนินที่ได้รับสาร L-NAME นอกจากนี้ผลจากการศึกษาการแสดงออกร่วมของโปรตีน Fos และ NOS และ การแสดงออกร่วมของโปรตีนCGRP และ NOS ด้วยวิธี double immunohistochemistry พบว่า เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NOS นั้นอยู่ร่วมในบริเวณเดียวกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Fos และ CGRP ในหนูทดลองทุกกลุ่ม

สรุป: จากการที่การยับยั้งการสร้าง nitric oxide สามารถลดการกระตุ้นต่อระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองในหนูที่มีระดับซีโรโดนินต่ำได้ ดังนั้นการเพิ่มการกระตุ้นต่อระบบรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองในภาวะที่มีซีโรโดนินต่ำจึงน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการมีระดับของ NO เพิ่มขึ้นกว่าปกติในภาวะที่มีซีโรโดนินต่ำ

คำสำคัญ - Cortical spreading depression, serotonin, ultrastructure, Fos, trigeminal nucleus caudalis, nitric oxide

สรุปโครงการ (Executive Summary)

ความสำคัญของปัญหา

โรคปวดศีรษะจากหลอดเลือด (vascular headache) โดยเฉพาะไมเกรน (migraine) เป็นปัญหาทางประสาทวิทยาที่พบได้บ่อย และมีแนวโน้มว่าจะมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นในสภาพสังคมปัจจุบัน จากการศึกษาถึงอุบัติการณ์การเกิดโรคนี้พบว่า อุบัติการณ์สูงขึ้นถึงร้อยละ 49 เมื่อศึกษาในคลินิกเฉพาะโรค (Srikiatkachorn and Phantumchinda, 1992) ในปัจจุบัน มีหลักฐานที่แสดงว่าพยาธิกำเนิดของภาวะนี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในระบบการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ (cranial vascular control) และระบบการควบคุมการเกิดความเจ็บปวด ตัวอย่างของหลักฐานดังกล่าว ได้แก่ การพบการเปลี่ยนแปลงในอัตราการใช้ของหลอดเลือดในหลอดเลือดบริเวณศีรษะ ขณะที่ผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวด (Sakai and Mayer, 1978) และยาหลายชนิดที่มีผลการทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด เช่น ยาในกลุ่ม ergot alkaloids และอนุพันธ์จันทน์กลุ่ม triptan มีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวดศีรษะในภาวะนี้ โดยปราศจากฤทธิ์เป็นยาระงับปวด เนื่องจากหลอดเลือดขนาดต่าง ๆ ภายในศีรษะ มีใยประสาทที่ทำหน้าที่รับความรู้สึกเจ็บปวดมาสิ้นสุดเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อหลอดเลือดเหล่านี้จึงสามารถทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ ในส่วนของความผิดปกติในระบบควบคุมความเจ็บปวดนั้น จากการศึกษาทางชีวเคมีพบว่า ในผู้ป่วยไมเกรน ขณะมีอาการจะมีระดับของสารสื่อประสาทซีโรโตนิน (serotonin หรือ 5-HT) ในเกร็ดเลือดลดลง ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของระดับซีโรโตนินและอนุพันธ์ คือ 5-hydroxy-indole acetic acid (5-HIAA) ในปัสสาวะ (Anthony et al., 1969, Ferrari and Saxena, 1993) สารซีโรโตนิน เป็นสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญทั้งในระบบปรับเปลี่ยนการรับความเจ็บปวด (pain modulatory system) และระบบการควบคุมหลอดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่ายาหรือสารเคมีที่ทำให้เกิดการลดลงของซีโรโตนิน เช่นยา reserpine สามารถกระตุ้นให้ผู้ป่วยไมเกรนเกิดอาการปวดศีรษะได้ และในผู้ป่วยไมเกรนที่มีอาการปวดเรื้อรังซึ่งเป็นผลจากการใช้ยาแก้ปวดติดต่อกัน (analgesics rebound headache) นั้นพบว่าระดับซีโรโตนินที่ต่ำกว่าผู้ป่วยไมเกรนทั่วไป (Srikiatkachorn and Anthony, 1996)

ปัจจุบัน ได้มีความก้าวหน้าเกี่ยวกับสรีรวิทยาของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมหลอดเลือดของสมอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความรู้เกี่ยวกับบทบาทของสารเคมี (chemical messenger) ชนิดต่าง ๆ ในกระบวนการดังกล่าว ผลการศึกษาในอดีตบ่งชี้ว่าการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดในโพรงกระโหลกศีรษะอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างระบบประสาทและกลไกเฉพาะที่ของหลอดเลือด ความก้าวหน้าที่สำคัญในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา คือ สารสื่อประสาทชนิดต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดทำงานโดยผ่านกลไกที่อาศัยเซลล์เอนโดทีเลียม (endothelium dependent mechanism) กล่าวคือกระตุ้นให้เซลล์เอนโดทีเลียมปลดปล่อยสารเคมีที่ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด เป็นผลให้หลอดเลือดขยายตัว (vasodilation) สารเคมีนี้เรียกกันในระยะแรกว่า endothelium derive relaxing factor (EDRF) และเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่า คือ ไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide: NO)

เนื่องจากหลอดเลือดขนาดต่าง ๆ ภายในศีรษะ มีใยประสาทที่ทำหน้าที่รับความรู้สึกเจ็บปวดมาสิ้นสุดเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อหลอดเลือดเหล่านี้จึงสามารถทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ ไม่ว่าสิ่งกระตุ้นนั้นจะมีพยาธิสภาพที่ชัดเจน เช่น การอักเสบของหลอดเลือด (vasculitis), การดึงรั้ง (traction), การแตกปริ (dissection) หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงในการทำงาน (function change) เช่น การเกิดการอักเสบปลอดเชื้อ (neurogenic sterile inflammation) ในกรณีของโรคปวดศีรษะไมเกรน เป็นต้น จากหลักฐานที่ผ่านมาบ่งชี้ว่า ไนตริกออกไซด์น่าจะมียบทบาทในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะที่เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ใน

การศึกษาของ Iversen และคณะพบว่า การให้ nitroglycerin สามารถกระตุ้นให้ผู้ป่วยไมเกรนเกิดอาการปวดศีรษะที่มีลักษณะต่างจากคนปกติ (Thompson et al., 1993) ผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าผู้ป่วยไมเกรนมีความไวต่อไนตริกออกไซด์มากกว่าปกติ (supersensitivity) และกลุ่มผู้ศึกษาได้ตั้งสมมติฐานว่า ความผิดปกติในการตอบสนองต่อไนตริกออกไซด์ น่าจะเป็นกลไกที่สำคัญในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะในภาวะนี้ (Olesen et al., 1993)

นอกจากนี้ในการศึกษาในแบบจำลองโรคปวดศีรษะในหนู จากปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ซึ่งเป็นแบบจำลองที่ได้รับการยอมรับในการศึกษาวิจัยโรคปวดศีรษะไมเกรน คณะผู้วิจัยได้พบว่าการกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง NO เพิ่มขึ้นในบริเวณผิวสมองของสัตว์ทดลองได้ (Read et al., 1997)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณ NO นั้นยังสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงการเกิดคลื่นไฟฟ้าบนผิวสมอง (Depolarization shift) จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ด้วยนอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณของ NO ที่เพิ่มขึ้น นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนเลือดบนผิวสมอง (Cortical blood flow) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่พบได้ในผู้ป่วยไมเกรน (Fabricius et al., 1995)

แม้ว่าจากการศึกษาที่ผ่านมาจะให้รายละเอียดเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในภาวะไมเกรน แต่ความผิดปกติที่พบยังไม่สามารถอธิบายพยาธิกำเนิดของภาวะดังกล่าวได้ทั้งหมด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดเป็นขั้นตอนสำคัญในกลไกของการเกิดภาวะปวดศีรษะไมเกรน และทั้งไนตริกออกไซด์และซีโรโตนินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการดังกล่าว โครงการการวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสารเคมีทั้งสองต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมองในโครงสร้างระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ultrastructure) และการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวด

ผลของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะทำให้เข้าใจถึงบทบาทของ NO และซีโรโตนิน ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน รวมทั้งสามารถใช้เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนาการรักษาโรคปวดศีรษะไมเกรนได้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและอาการปวดศีรษะในผู้ป่วยไมเกรนนับเป็นสิ่งที่มีความสำคัญและศึกษากันมาเป็นเวลานาน ความสัมพันธ์ดังกล่าวมีรากฐานจากลักษณะทางอาการวิทยาอาการปวดศีรษะที่มีลักษณะต่างๆตามการเต้นของชีพจร (pulsating headache) การศึกษาโดยการกระตุ้นหลอดเลือดด้วยวิธีต่างๆ เช่น ขยายหลอดเลือดเฉพาะที่ การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า หรือการจี้ด้วยความร้อนต่อบริเวณส่วนต้นของหลอดเลือดแดงในเยื่อหุ้มสมองชั้น pia เยื่อหุ้มสมอง dura บริเวณที่ชัดเจนที่ติดกับหลอดเลือดแดงของเยื่อหุ้มสมองหรือ dura sinuses สามารถทำให้เกิดอาการปวดศีรษะในตำแหน่งต่างๆกัน (Penfield and McNaughton, 1940 ; Feindel et al., 1960) การศึกษาทางสรีรวิทยาของการไหลเวียนของเลือดในสมองด้วยวิธีต่างๆในระยะต่อมาล้วนสนับสนุนถึงความสำคัญของระบบหลอดเลือดในพยาธิสรีรวิทยาของอาการปวดศีรษะอาทิ การศึกษาของ Sakai และ Mayer ในปี 1978 ซึ่งได้ทำการศึกษาปริมาณการไหลเวียนเลือดใน extracranial vessels และพบว่าในขณะที่มีอาการปวดศีรษะไมเกรนจะมีปริมาณเลือดเพิ่มขึ้นร้อยละ 50 (Sakai and Mayer, 1978) จากการศึกษาโดยวิธี single photon emission computerized tomography (SPECT) Lauritzen และคณะ(1994) พบว่าในช่วงที่มีผู้ป่วยมีอาการนำ (aura) จะมีการลดลงของปริมาณเลือดเฉพาะที่ (regional cerebral blood flow) ปริมาณ 17% (โดยปริมาณเลือดอยู่ระหว่าง 41-66 มิลลิลิตร/เนื้อสมอง 1 กรัม/นาที) ซึ่งการลดลงของปริมาณเลือดนี้อาจสัมพันธ์กับการเกิดความผิดปกติทางระบบประสาทที่พบได้ในผู้ป่วยไมเกรนขณะที่มีอาการ จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้มีผู้สันนิษฐานว่าอาการปวดเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด (vascular headache)

ความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานเกี่ยวกับการระบบหลอดเลือดภายในโพรงกะโหลกศีรษะ ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างหลอดเลือดและระบบประสาท ทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงกลไกที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและปริมาณเลือด ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่มีอาการปวดศีรษะไมเกรน กระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญยิ่งคือการทำงานของระบบประสาท trigeminovascular system (del Rio and Moskowitz, 2000) วงจรประสาทในระบบนี้มีหน้าที่ที่สำคัญ 2 ประการคือ (1) เป็นเส้นทางที่ผ่านกระแสประสาทที่เกิดจากการกระตุ้นตัวรับ nociceptor ที่อยู่รอบหลอดเลือดเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางและ (2) ไปยังหลอดเลือดเหล่านี้ควบคุมการเกิดการอักเสบปลอดเชื้อที่เกิดจากการกระตุ้นเส้นประสาท (neurogenic sterile inflammation) ความผิดปกติในการควบคุมทำงานของระบบนี้เป็นกลไกพื้นฐานที่นำไปสู่อาการปวดศีรษะไมเกรนและ cluster นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับประสาทเภสัชวิทยาของสารสื่อประสาทในระบบนี้ยังเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนาสำหรับบรรเทาอาการปวดศีรษะในกลุ่มโรคนี้

ระบบรับการกระตุ้น nociception ของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ (nociceptive system of cranial vessel)

โดยรอบของหลอดเลือดขนาดใหญ่ในบริเวณฐานกะโหลก หลอดเลือดขนาดเล็กในชั้น pia และหลอดเลือดดำขนาดใหญ่ภายในโพรงกะโหลกศีรษะ มีร่างแหของใยประสาท (perivascular nerve plexus) พันอยู่ในชั้น adventitia โดยการศึกษาด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่าบางส่วนของภายในใยประสาทเหล่านี้มีเปปไทด์ เช่น substance P (SP) (Liu-chen et al., 1983) และ calcitonin gene related peptide (CGRP) (Uddman et al., 1985) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าใยประสาท SP-immunoreactive fiber ที่ประกอบกันเป็น

ร่างแห adventitia เป็นเส้นใยประสาทขนาด C-fiber และไม่มีปลอก myelin ห่อหุ้ม (Liu-Chen et al., 1986) อันเป็นลักษณะของ nociceptive fiber

เมื่อมีการกระตุ้นเส้นประสาท trigeminal กระแสประสาทจะผ่านเข้าสู่ปลาย central axon (orthodromic conduction) และสิ้นสุดโดยสัมผัสกับเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ trigeminal nucleus caudalis ซึ่งทำหน้าที่คล้าย dorsal horn ของไขสันหลัง ในบริเวณนี้จะมีการปรับเปลี่ยนกระแสประสาทก่อนจะผ่านไปยัง thalamus และ somatosensory cortex เพื่อแปลเป็นความรู้สึกปวดศีรษะ

ปรากฏการณ์ cortical spreading depression

การศึกษาปรากฏการณ์นี้เริ่มจากการรายงานของ Leão ในปี 1944 โดยพบว่า ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของคลื่นไฟฟ้าสมองที่บันทึกได้จากสมองใหญ่ของกระต่าย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประกอบด้วยระยะการกระตุ้นเซลล์ประสาท และตามด้วยการลดลงในขนาดของคลื่นไฟฟ้าสมองในบริเวณนั้น คลื่นของความเปลี่ยนแปลงนี้แผ่ขยายไปด้วยความเร็วประมาณ 2-3 มิลลิเมตรต่อนาที Leão ได้เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า cortical spreading depression (CSD) การเปลี่ยนแปลงของลักษณะไฟฟ้าของผิวสมองใหญ่ที่เริ่มจากการกระตุ้น และตามด้วยการลดลงของการทำงานนี้เป็นลักษณะสำคัญของปรากฏการณ์ CSD ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางคลินิกที่พบในระยะออรา กล่าวคือ ระยะการกระตุ้นอาจทำให้เกิดอาการเชิงบวก เช่น การเห็นแสงเป็นเส้นหยักในลานสายตา ในขณะที่ระยะยับยั้งอาจเป็นพยาธิกำเนิดของอาการเชิงลบ เช่น การเกิดเงามืด เป็นต้น ดังนั้นจึงเชื่อว่าปรากฏการณ์ CSD น่าจะเป็นพยาธิสรีรกำเนิดของความผิดปกติทางระบบประสาทที่พบในระยะออรา

การกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ CSD ในสมองสัตว์ทดลองนั้น สามารถกระทำได้โดยวิธีต่างๆ อาทิ การกระตุ้นด้วยไฟฟ้าหรือแรงกลที่ผิวสมองใหญ่ รวมถึงการกระตุ้นโดยใช้โปแตสเซียมที่มีความเข้มข้นสูง นอกจากบริเวณผิวสมองใหญ่แล้ว ปรากฏการณ์ CSD ยังสามารถเกิดได้ในสมองส่วนเนื้อเทา (gray matter) ตำแหน่งอื่นๆ อาทิ ฮิปโปแคมปัส (hippocampus) หรือสมองน้อย (cerebellum) เป็นต้น การศึกษาในเยื่อสมองใหญ่ของมนุษย์ที่ตัดแยกออกจากตัวพบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่มีลักษณะของ CSD ได้ (Avoli et al., 1991) หลักฐานนี้บ่งว่า โครงสร้างของสมองใหญ่ของมนุษย์เอื้อต่อการเกิด CSD ได้เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในสมองใหญ่ของสัตว์

กระบวนการเกิด CSD เริ่มต้นจากการเกิด depolarization ของเซลล์ประสาทและเซลล์เกลีย ซึ่งทำให้เกิดลักษณะ spike activity เมื่อบันทึกด้วยเครื่องบันทึกคลื่นไฟฟ้าสมอง การกระตุ้นนี้จะคงอยู่เพียงเวลาสั้นๆ (เป็นวินาที) จากนั้นเซลล์ประสาทบริเวณดังกล่าวจะทำงานลดลง ซึ่งแสดงด้วยการลดลงของคลื่นไฟฟ้าสมอง (electrical silence) การลดลงในการทำงานนี้จะคงอยู่นานประมาณ 15 ถึง 30 นาที การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลให้ศักย์ไฟฟ้ากระแสตรง (direct current potential) ของสมองใหญ่ลดลง การเกิด depolarization ของเซลล์ประสาทและเซลล์เกลียจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไอออนและสารสื่อประสาทต่างๆ (Lauritzen, 1994 ; Lauritzen, 2000 ; James et al., 2001) กล่าวคือ ในตำแหน่งที่เกิด CSD จะมีการเพิ่มขึ้นของโปแตสเซียมไอออนภายนอกเซลล์ $[K^+]_o$ โปแตสเซียมไอออนที่สูงขึ้นจะกระตุ้นให้เซลล์ประสาทในบริเวณข้างเคียงเกิด depolarization ทำให้โซเดียมไอออนจะผ่านเข้าสู่เซลล์มากขึ้น การผ่านเข้าสู่เซลล์ของโซเดียมจะส่งผลให้อิออนของน้ำผ่านเข้าเซลล์ตามจนทำให้เซลล์ประสาทเกิดการบวมขึ้น และปริมาณของเซลล์ประสาทที่อยู่ในระยะ depolarization จะปลดปล่อยสารสื่อประสาทกลูตาเมตจากปลายแอกซอน (Scheller et al., 1990 ; Szerb, 1991) สารกลูตาเมตที่ถูกปล่อยเหล่านี้จะจับกับตัวรับชนิด NMDA (Avoli et al., 1995) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นช่องทางอิ

อนที่ขอมให้โซเดียมและแคลเซียมผ่าน เป็นผลให้ระดับของโซเดียมไอออนและแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นสูงขึ้น แคลเซียมไอออนจะกระตุ้นเอนไซม์ nitric oxide synthase และทำให้อัตราการสร้างไนตริกออกไซด์สูงขึ้น เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราการไหลของเลือดในสมองบริเวณนั้น

การเกิดปรากฏการณ์ CSD สามารถกระตุ้นใยประสาท nociceptor ในระบบ trigeminovascular pathway โดยจะเห็นได้จากการพบการเพิ่มขึ้นของ Fos-immunoreactive neuron ในสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์นี้ การกระตุ้นใยประสาท nociceptor น่าจะเป็นผลของการเพิ่มขึ้นของโปแตสเซียมไอออนและกลูตาเมตในสารน้ำนอกเซลล์ เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าโปแตสเซียมไอออนสามารถกระตุ้น (activate) ใยประสาท nociceptor ได้โดยตรง ในขณะที่สารต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการอักเสบ อาทิ bradykinin สามารถลดระดับ threshold ของการกระตุ้นลง ทำให้ใยประสาท nociceptor สามารถถูกกระตุ้นได้โดยสิ่งกระตุ้นที่มีลักษณะเป็น subthreshold stimulus รวมทั้งตอบสนองมากขึ้นต่อตัวกระตุ้นที่เป็น subthreshold stimulus เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า receptor sensitization การเกิด sensitization ทั้งในระดับของตัวรับ nociceptor ที่เรียกว่า peripheral sensitization และระดับของ higher-order neuron อาทิ trigeminal nucleus caudalis neurons หรือเซลล์ประสาทใน thalamus ที่เรียกว่า central sensitization เป็นปรากฏการณ์ที่น่าจะมีความสำคัญในการเกิดอาการปวดศีรษะในผู้ป่วยโรคปวดศีรษะไมเกรน

หลอดเลือดสมอง : ลักษณะทางกายวิภาคและสรีรวิทยาของเซลล์เอนโดทีเลียม

สมองและไขสันหลังเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญยิ่งในการทำงานของร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงได้พัฒนากลไกต่างๆเพื่อช่วยรักษาอวัยวะเหล่านี้ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสมองและไขสันหลังต้องการเลือดไปเลี้ยงเป็นอัตราที่สูงกว่าอวัยวะอื่น ร่างกายจึงพัฒนาให้สมองมีระบบไหลเวียนเลือดซึ่งมีลักษณะพิเศษที่สามารถปรับอัตราการไหลของเลือด (cerebral blood flow) ให้มีค่าค่อนข้างคงที่ ไม่ขึ้นลงตามความดันเลือดของร่างกาย และมีอัตราการไหลเฉพาะที่ (regional cerebral blood flow) แปรไปตามการทำงานของเซลล์ประสาทในบริเวณนั้นๆ นอกเหนือจากลักษณะดังกล่าว หลอดเลือดในสมองส่วนใหญ่ยังมีคุณสมบัติที่ไม่ยอมให้มีการซึมผ่านของสารต่างๆได้โดยง่าย ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการควบคุมให้ลักษณะของของเหลวนอกเซลล์ (extracellular fluid) เช่น ความเข้มข้นของไอออนต่างๆมีค่าคงที่ ไม่แปรเปลี่ยนไปตามการเปลี่ยนแปลงของระดับในเลือด คุณสมบัติดังกล่าวเป็นที่มาของแนวคิดเรื่อง blood-brain barrier จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้สามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างที่ทำหน้าที่เป็น blood-brain barrier คือ เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดสมอง

ลักษณะของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมอง

เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดฝอยในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ blood-brain barrier มีลักษณะทางโครงสร้างและการทำงานที่ต่างไปจากเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดฝอยในอวัยวะอื่นๆ (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

- มีโครงสร้างบริเวณรอยต่อของเซลล์เป็น tight junction (zonular occludens) จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า เซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดฝอยสมองเรียงชิดกันโดยไม่มีรอยต่อระหว่างเซลล์ ในขณะที่หลอดเลือดอื่นมีช่องว่างระหว่างเซลล์เอนโดทีเลียมที่เรียกว่า gap

junction จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวทำให้สารที่มีขนาดอนุใหญ่ไม่สามารถแทรกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ออกไปได้

- มีกระบวนการนำสารผ่านเซลล์โดยวิธี pinocytosis น้อย จากการศึกษาของ Dux และคณะพบว่า เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดสมองของหนูมี pinocytic vesicle เพียง 4 vesicle/ตารางไมโครเมตร (Dux and Joo, 1982)
- เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดสมอง มีจำนวนไมโทคอนเดรียสูงกว่าเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดอื่น โดยมีปริมาตรคิดเป็นร้อยละ 10 ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมดบ่งชี้ว่า เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดสมองมีการทำงานที่ต้องอาศัยพลังงานมากกว่าเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดอื่น
- มีระบบพิเศษเพื่อใช้ขนส่งสารผ่านผนังเซลล์ (facilitated transport system) เนื่องจากในภาวะปกติ เซลล์เอนโดทีเลียมยอมให้สารที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic ผ่านผนังเซลล์ได้น้อยมาก ดังนั้น เซลล์เอนโดทีเลียมจึงมีการพัฒนาระบบเพื่อใช้ขนส่งสารละลายบางชนิดขึ้นเป็นพิเศษ ลักษณะที่สำคัญของระบบขนส่งนี้คือ มีความจำเพาะสำหรับสารแต่ละชนิด รวมไปถึง stereospecificity, มีจุดอิ่มตัว (saturation kinetics), และมี competitive interaction ระหว่างสารที่มีลักษณะคล้ายกัน สารที่ถูกขนส่งโดยใช้กระบวนการนี้ ได้แก่ กลูโคส, กรดอะมิโน และโคลีน เป็นต้น
- มีอัตราการทำงานของเอนไซม์บางชนิดสูงกว่าเซลล์เอนโดทีเลียมทั่วไป เอนไซม์ดังกล่าว ได้แก่ ecto-nucleotidase, alkaline phosphatase, γ -GTP, p-glycoprotein และ Na-K-ATPase โดยเฉพาะเอนไซม์ Na-K-ATPase นั้นมีอัตราการทำงานสูงกว่าเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดสายสะดือถึง 500 เท่า (Eisenberg and Suddith, 1979)
- มีค่าศักย์ไฟฟ้าและความต้านทานระหว่างเซลล์เอนโดทีเลียมและเนื้อสมอง (transendothelial potential and resistance สูง) นอกจากนี้ค่าความต้านทานข้ามเซลล์เอนโดทีเลียม (transendothelial resistance) ของหลอดเลือดสมองยังมีความสูงมากเมื่อเทียบกับหลอดเลือดบริเวณอื่น กล่าวคือมีค่าระหว่าง 1500-2000 โอห์ม/ตารางเซนติเมตร (Crone and Olesen, 1984) ค่าดังกล่าวสูงกว่าในหลอดเลือดอื่น ๆ ถึงกว่าร้อยเท่า
- มีค่า reflection coefficient สูงและค่า hydraulic conductivity ต่ำ ตัวอย่างเช่นมีค่า reflection coefficient สำหรับซูโครสสูงกว่าหลอดเลือดอื่น ๆ ประมาณ 10 เท่า

นอกจากลักษณะพิเศษของเซลล์เอนโดทีเลียมแล้ว หลอดเลือดฝอยในสมองยังมีโครงสร้างที่ต่างจากหลอดเลือดฝอยในบริเวณอื่นของร่างกาย โดยเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดนี้เรียงชิดกันบนเยื่อ basement membrane (basal lamina) ซึ่งประกอบขึ้นจาก collagen, โปรตีนอื่นๆ และ proteoglycan โครงสร้างนี้มีหน้าที่รองรับเซลล์เอนโดทีเลียม, เป็นแผ่นกรองชนิด semipermeable และเป็นโครงสำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ในระหว่างช่วงของการเจริญเติบโต เนื่องจากเยื่อ basement membrane มีความแข็งแรงต่อการกด (tensile strength) ดังนั้นจึงเชื่อว่าเยื่อนี้จะมีบทบาทในการรักษารูปร่างของหลอดเลือดฝอย และป้องกันการแตกของหลอดเลือด เยื่อ basement membrane จะหนาขึ้นในบางพยาธิสภาพ เช่น โรคเบาหวาน ความดันเลือดสูง อายุมาก เป็นต้น

โครงสร้างที่อยู่ชิดกับเยื่อ basement membrane ทางด้านนอก (abluminal side) ของหลอดเลือดฝอย คือ เซลล์เพอร์ไซท์ (pericyte) เนื่องจากเซลล์มีตำแหน่งชิดกับเยื่อ basement membrane จึงเชื่อว่าน่าจะทำหน้าที่สร้างสารที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อ basement membrane, เก็บกิน (phagocytosis) สารแปลกปลอมที่อยู่รอบหลอดเลือด, รักษาโครงสร้างของหลอดเลือดฝอย และควบคุมการเจริญของเซลล์เอนโดทีเลียม ทั้งนี้อาจรวมไปถึงบทบาทในการควบคุมอัตราการไหลของเลือดในหลอดเลือดฝอยด้วย

หลอดเลือดฝอยของสมองมีความสัมพันธ์กับเซลล์นิวโรเกลียอย่างใกล้ชิด กล่าวคือผนังด้านนอกของหลอดเลือดถูกหุ้มด้วยส่วน foot process ของเซลล์แอสโตรไซท์ (astrocyte) เนื่องจากเซลล์แอสโตรไซท์ให้แขนงไปยังเซลล์ประสาทและเซลล์อีเพนโดมา (ependymal cell) ที่บุอยู่รอบโพรงสมองด้วย ดังนั้นจึงเชื่อว่าเซลล์แอสโตรไซท์น่าจะมีหน้าที่ที่สัมพันธ์กับเซลล์ดังกล่าว การศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์นอกอวัยวะพบว่าเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดสมองจะมีการเรียงตัวหรือมีการสร้าง tight junction ซึ่งเป็นลักษณะของ blood-brain barrier รวมถึงมีความสามารถในการควบคุมการซึมผ่านของสารอนุใหญ่ เฉพาะเมื่อมีการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโตรไซท์ร่วมด้วยเท่านั้น (Wolberg et al., 1994) ผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าเซลล์แอสโตรไซท์มีบทบาทสำคัญยิ่งในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดสมองมีลักษณะของ blood-brain barrier อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ in vivo ซึ่งศึกษาผลของการขาดเซลล์แอสโตรไซท์ในสมองตัวอ่อนพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในการเจริญของ blood-brain barrier อย่างมีนัยสำคัญ (Krum, 1996) การสูญเสียความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์เอนโดทีเลียมและเซลล์แอสโตรไซท์จะทำให้หลอดเลือดสมองเสียคุณลักษณะของ blood-brain barrier ดังตัวอย่างที่พบในหลอดเลือดของเนื้องอกสมอง เป็นต้น

บทบาทของเซลล์เอนโดทีเลียมในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด

กระบวนการควบคุมการไหลของเลือดในสมอง (cerebral blood flow) และความตึงตัวของหลอดเลือดในสมองเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ทั้งนี้เนื่องจากสมองเป็นอวัยวะที่ต้องการเลือดเป็นปริมาณสูงกว่าอวัยวะอื่นคือประมาณ 50 มิลลิลิตร/100 กรัมของเนื้อสมอง/นาที ในภาวะปกติอัตราการไหลของเลือดที่ไปยังสมองโดยรวมจะมีค่าค่อนข้างคงที่และไม่แปรไปตามการเปลี่ยนแปลงของความดันเลือด ซึ่งเรียกระบบการควบคุมนี้ว่า autoregulation (Chillon and Baumbach, 1997)

เซลล์เอนโดทีเลียมมีบทบาทอย่างสูงในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular tone) หลอดเลือดสมองที่ขาดเซลล์เซลล์เอนโดทีเลียมจะสูญเสียการทำงานในหลายลักษณะ เซลล์เอนโดทีเลียมควบคุมการหดหรือการขยายตัวของหลอดเลือดโดยอาศัยการหลั่งสารเคมีชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต่อหลอดเลือด (vasoactive substances) สารที่หลั่งจากเซลล์เอนโดทีเลียมและมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (endothelial derived relaxing factors หรือ EDRFs) เช่น พรอสตาซัยคลิน (prostacyclin), อะดีโนซีน (adenosine) และอนุพันธ์, ไนตริกออกไซด์ (NO) (Faraci and Brian, 1994 ; Dalkara and Moskowitz, 1997) สำหรับสารที่หลั่งจากเซลล์เอนโดทีเลียมและมีผลกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (endothelial-derived contractile factors (EDCFs) ซึ่งสารในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญ คือ เอนโดทีลิน (endothelin) นอกจากนี้เซลล์เอนโดทีเลียมยังมีเอนไซม์ angiotensin converting enzyme ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน angiotensin I ให้เป็น angiotensin II ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์แรงในการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด

ไนตริกออกไซด์เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด (Dalkara and Moskowitz, 1997) ลักษณะที่แตกต่างระหว่างบทบาทของไนตริกออกไซด์ในหลอดเลือดของระบบประสาทส่วนกลางและอวัยวะในระบบอื่น คือ ในสมองและไขสันหลังมีเซลล์หลายชนิดที่สามารถสร้างไนตริกออกไซด์ได้ นอกจากเซลล์เอนโดทีเลียมแล้ว เซลล์ประสาทในเนื้อสมองหรือในปมประสาทต่างๆ โดยเฉพาะปมประสาทพาราซิมพาเทติกต่างสามารถสร้างไนตริกออกไซด์ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ประสาทเหล่านั้นมีเอนไซม์ nitric oxide synthase (neuronal NOS หรือ nNOS) เซลล์ประสาทที่สามารถสร้าง NO เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการปรับอัตราไหลของเลือดให้เหมาะสมกับการทำงานของเซลล์ประสาท (Iadecola, 1993)

ความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียม

โดยลักษณะพิเศษของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดฝอยของสมอง ทำให้สารน้ำและสารที่ละลายในน้ำซึมผ่านผนังหลอดเลือดได้อย่างจำกัด ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทำหน้าที่ควบคุมให้ปริมาณของสารน้ำภายในและภายนอกหลอดเลือดมีปริมาตรที่เหมาะสม เมื่อสมองมีพยาธิสภาพบางประการเกิดขึ้น การทำงานของ blood-brain barrier จะเสียไป กล่าวคือผนังหลอดเลือดยอมให้สารซึ่งมีขนาดอนุภาคต่างๆ เคลื่อนที่ผ่านได้มากกว่าปกติ การสูญเสียความสามารถในการกักกันสารจะเป็นผลให้เกิดการรั่วของสารต่างๆ ออกสู่เนื้อสมอง และนำไปสู่การเคลื่อนที่ของน้ำจนเกิดภาวะสมองบวม (brain edema) เรียกภาวะสมองบวมที่เป็นผลจากการสูญเสียสภาพของ blood-brain barrier ว่า vasogenic brain edema

การศึกษาโดยการฉีดสารทึบอิเล็กตรอน (electron dense material) เช่น horseradish peroxidase และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เอนโดทีเลียมในพยาธิสภาพต่างๆ เช่น สมองขาดเลือด บ่งชี้ว่าการเพิ่มการขนส่งผ่าน vesicular transport อาจเป็นกลไกสำคัญในการหลั่งของสารที่มีอนุภาคใหญ่ (macromolecule) จากหลอดเลือด (Beggs and Waggener, 1976) พยาธิสภาพที่ทำให้เซลล์เอนโดทีเลียมยอมให้สารอนุภาคใหญ่ผ่านได้มากกว่าปกติ ได้แก่ การได้รับสารที่มี Osmolality สูง (osmotic injury), ความดันโลหิตสูง, ภาวะชัก, ภาวะสมองขาดเลือดหรือออกซิเจน, พิษจากคาร์บอนไดออกไซด์, พิษจากตะกั่ว (lead encephalopathy), ภาวะสมองผิดปกติจากไตวาย (uremic encephalopathy), ก้อนในสมอง เช่น เนื้องอก, ฝี หรือก้อนเลือด, เชื้อหุ้มสมองอักเสบชนิดเป็นหนอง (purulent meningitis), อันตรายจากการฉายรังสี (radiation injury), ฮอร์โมนบางชนิด, ทารกที่คลอดก่อนกำหนด และภาวะพิษจากสารบิลิรูบิน (kernicterus) การเพิ่มขึ้นของ permeability ของหลอดเลือดจนเกิดการรั่วในภาวะเหล่านี้เชื่อว่าอาจเกิดจากสารเคมีบางชนิด โดยเฉพาะกลุ่มออตาซอยด์ (autacoid) ซึ่งหลั่งจากเซลล์ที่มีพยาธิสภาพ เช่น แบรดีไคนิน (bradykinin), ฮิสตามีน (histamine), อนุพันธ์ของกรดอะราคิโดนิก (arachidonic acid) หรือกลุ่มอนุพลูอิสระ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide: NO)

ไนตริกออกไซด์: ลักษณะทางชีวเคมี

ไนตริกออกไซด์เป็นก๊าซอนุพันธ์อิสระที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ง่าย ความรู้เกี่ยวกับลักษณะทางเภสัชวิทยาของสารชนิดนี้ เป็นที่ทราบกันเป็นเวลานานก่อนที่จะพบว่าสารนี้สามารถถูกสร้างขึ้นภายในร่างกายและมีบทบาทสำคัญยิ่งในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด ตัวอย่างเช่น ยาขยายหลอดเลือดกลุ่มไนตริก เช่น nitroprusside, nitroglycerin ซึ่งออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง cyclic guanosine monophosphate (cGMP) เป็นผลให้เกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือดตลอดจนอวัยวะอื่นๆ นั้น ในปัจจุบันพบว่ายาในกลุ่มดังกล่าวออกฤทธิ์โดยผ่านการทำงานของไนตริกออกไซด์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารอื่นๆ ที่มีฤทธิ์

ขยายหลอดเลือด เช่น adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, thrombin, bradykinin and histamine ต่างออกฤทธิ์ผ่านการทำงานของไนตริกออกไซด์ทั้งสิ้น (Johns, 1991)

ไนตริกออกไซด์ถูกสร้างขึ้นจากกรดอะมิโน L-arginine โดยอาศัยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ในปัจจุบันได้แบ่งเอนไซม์ NOS ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ 2 ชนิดแรกจัดเป็นกลุ่ม constitutive NOS ซึ่งทำงานโดยอาศัยเอนไซม์ Ca^{2+} /calmodulin เอนไซม์ NOS ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ชนิดที่พบในเซลล์เอนโดทีเลียม (eNOS) และชนิดที่พบในเซลล์ประสาท (nNOS) (Snyder and Bredt, 1991) สำหรับชนิดที่สามซึ่งพบในเซลล์แมคโครฟาจ (mNOS) ทำงานโดยอาศัยการกระตุ้นจาก cytokine และไม่ขึ้นกับ calcium ion (Marletta et al., 1988)

ไนตริกออกไซด์มีความแตกต่างอย่างมากจากสารสื่อประสาททั่วไป สารชนิดนี้มีได้ถูกสร้างขึ้นและสะสมไว้ในถุงเก็บสารสื่อประสาท (transmitter vesicle) แต่จะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีความจำเป็นในการใช้งาน นอกจากนี้การเคลื่อนที่ผ่านเซลล์ยังอาศัยการแพร่ (diffusion) โดยไม่ผ่านกระบวนการ exocytosis และเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (target cell) โดยแพร่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ ดังนั้นกระบวนการเปลี่ยนสัญญาณ (transduction mechanism) จึงมิได้อาศัยตัวรับบนผนังเซลล์เช่นเดียวกับสารสื่อประสาทอื่นๆ ไนตริกออกไซด์ออกฤทธิ์เป็นระยะเวลาดสั้นโดยพบว่าผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์จะลดลงร้อยละ 50 ในเวลา 4 วินาที อนุภาคที่ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายของไนตริกออกไซด์คือ อนุภาคของ Fe ซึ่งอยู่ในเอนไซม์ guanylate cyclase (CG) (Bredt and Snyder, 1992) และอาจรวมถึงเอนไซม์อื่นๆ เช่น ADP-ribosyltransferase (Brune and Lapetina, 1989) นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ยังจับกับอนุภาคของ Fe ภายในเอนไซม์ภายในไมโทคอนเดรียที่ทำหน้าที่ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกระบวนการ electron transport chain, เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ citric cycle และกระบวนการสังเคราะห์ DNA

การสร้างไนตริกออกไซด์ในสมอง

การสร้างไนตริกออกไซด์ภายในสมองถูกสร้างจากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับในอวัยวะอื่นๆ เซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองสามารถสร้างไนตริกออกไซด์ (Moncada et al., 1991) โดยอาศัยเทคนิคทาง immunohistochemistry พบว่าภายในชั้น intimal ของหลอดเลือดสมองขนาดต่างๆพบ NOS immunoreactivity เซลล์ไมโครเกลีย (ซึ่งทำหน้าที่คล้ายเซลล์แมคโครฟาจในเนื้อเยื่ออื่นๆ) ที่ถูกกระตุ้นเป็นเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถสร้างไนตริกออกไซด์ โดยพบว่าเอนไซม์ NOS ที่พบในเซลล์ไมโครเกลียเป็นชนิด inducible (Boje and Arora, 1992) นอกจากนี้เซลล์ไมโครเกลียแล้วเอนไซม์ NOS ยังพบในเซลล์เกลียประเภทอื่นๆด้วย เช่น เซลล์แอสโตรไซต์ เป็นต้น

หลอดเลือดสมองถูกเลี้ยงด้วยเส้นประสาทที่ใช้สารสื่อประสาทชนิดต่างๆเป็นจำนวนมาก ซึ่งรวมไปถึงเส้นประสาทที่ใช้สารไนตริกออกไซด์และสามารถตรวจพบเอนไซม์ NOS ได้ (Bredt and Snyder, 1992)

นอกเหนือจากเซลล์เอนโดทีเลียมและเซลล์ประสาทในปมประสาทพาราซิมพาเทติกแล้ว เซลล์ประสาทที่มีเอนไซม์ NOS ยังสามารถพบได้ในเนื้อสมอง เซลล์เหล่านี้พบได้ในสมองส่วน olfactory bulb, basal forebrain, medulla, hypothalamus, striatum, hippocampus, cerebellum และ cerebral cortex โดยมีความหนาแน่นสูงสุดในสมองส่วน cerebellum และต่ำสุดในก้านสมองส่วน medulla (Forsterman et al., 1990)

บทบาทของไนตริกออกไซด์ในพยาธิกำเนิดของภาวะไมเกรน

ได้มีผู้ตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับบทบาทของไนตริกออกไซด์ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน ทั้งนี้เนื่องจากผลของไนตริกออกไซด์ที่มีต่อหลอดเลือดสมองมีลักษณะที่ต่างจากหลอดเลือดบริเวณอื่น จากการศึกษาของ Iversen พบว่าหลอดเลือดบริเวณศีรษะจะตอบสนองต่อไนตริกออกไซด์มากกว่าหลอดเลือดบริเวณอื่น ซึ่งการตอบสนองนี้จะรุนแรงมากขึ้นเมื่อให้ *N*-acetylcysteine ซึ่งเป็นสารที่แตกตัวให้กลุ่มซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl group) และจำเป็นในการออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (Iversen, 1992) นอกจากนี้ระหว่างการให้ไนตริกออกไซด์หยดเข้าทางหลอดเลือดดำยังทำให้อาสาสมัครเกิดอาการปวดศีรษะ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับอาการปวดศีรษะที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยไมเกรน (Iversen, 1989) ในระยะหลังได้มีผู้ศึกษาความสัมพันธ์ของไนตริกออกไซด์และพยาธิกำเนิดของโรคไมเกรนในคน ในปี 1993 Thomsen และคณะได้ศึกษาฤทธิ์ของ nitroglycerin (ซึ่งออกฤทธิ์โดยการเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์) โดยการหยดเข้าหลอดเลือดดำและศึกษาผลในการกระตุ้นให้เกิดอาการปวดศีรษะตลอดจนเปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลเวียนของเลือดภายในกะโหลกศีรษะ (ศึกษาโดยใช้ transcranial Doppler) ผลการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยโรคไมเกรนจะมีการขยายตัวของหลอดเลือดรวมทั้งอาการปวดศีรษะมากกว่ากลุ่มควบคุม (Thompson et al., 1993) ซึ่งผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าผู้ป่วยไมเกรนน่าจะมีความไวต่อไนตริกออกไซด์มากกว่าในคนปกติ (NO supersensitivity) และความผิดปกตินี้อาจเป็นกลไกสำคัญในการเกิดอาการปวดศีรษะ (Olesen et al., 1996) การศึกษาในสัตว์ทดลองโดยกระตุ้นให้เกิด spreading depression (ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ทางสรีรวิทยาที่เชื่อว่าเป็นรากฐานของการเกิดอาการนำในภาวะไมเกรน) ด้วยโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) และศึกษาปริมาณของเอนไซม์ NOS ในเซลล์เอนโดทีเลียม ผลการศึกษาพบว่ามีเพิ่มขึ้น (up-regulation) ของ NOS ในเซลล์ดังกล่าวทั้งที่สมองส่วน cerebral cortex และ striatum (Chopp et al., 1993) นอกจากนี้ยังพบว่ายาในกลุ่ม 5-HT_{1B/1D} agonist สามารถลดการกระตุ้น NOS และปริมาณของ NO ที่เกิดขึ้นเมื่อกระตุ้นให้สมองเกิด CSD ผลการศึกษานี้บ่งชี้ถึงบทบาทของเซลล์เอนโดทีเลียมและ NO ในการเกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่เกิดตามหลังภาวะ cortical spreading depression นอกจากนี้การศึกษาทาง immunohistochemistry ยืนยันว่าเซลล์ประสาทในกลุ่มเซลล์ trigeminal มีเอนไซม์ NOS ซึ่งแสดงว่าไนตริกออกไซด์มีบทบาทในกระบวนการรับความเจ็บปวดจากอวัยวะบริเวณศีรษะ (Dohrn and Beits, 1994) รวมไปถึงกระบวนการเกิด central sensitization จากหลักฐานทั้งในสัตว์ทดลองและในคนดังที่กล่าวข้างต้นต่างบ่งชี้ถึงบทบาทของไนตริกออกไซด์ในการเกิดภาวะไมเกรน

ซีโรโตนินและพยาธิกำเนิดของโรคไมเกรน

ซีโรโตนินเป็นสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญ ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทส่วนปลาย ส่วนใหญ่ของซีโรโตนินที่ตรวจพบในร่างกายอยู่ที่เซลล์ enterochromaffin ในผนังลำไส้เล็ก, สมอง, ต่อมไพเนียล (pineal gland) และเซลล์เกร็ดเลือด ในระบบประสาทเซลล์ที่สร้างซีโรโตนินจะรวมตัวกันอยู่ในแนวกึ่งกลางของก้านสมองเรียกว่ากลุ่มเซลล์ nucleus raphe เซลล์ซีโรโตนินเหล่านี้จะให้แขนงประสาทกระจายไปยังส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลัง และทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ เช่น วงจรการหลับ-ตื่น การควบคุมอารมณ์ และที่สำคัญคือ ระบบการปรับความเจ็บปวด ภาวะบกพร่องซีโรโตนินที่เกิดจากสาเหตุต่างๆ สามารถกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดในบริเวณต่างๆของร่างกายได้ (Sicuteri and Nicolodi, 1997) เช่นเดียวกับส่วน dorsal horn ของไขสันหลัง ใยประสาทซีโรโตนินที่ผ่านลงมาทาง dorsolateral funiculus จะมาสิ้นสุดที่เซลล์

ประสาทของกลุ่มเซลล์ไพโรเจมมินาลคอคาลิส และทำหน้าที่ปรับเปลี่ยนกระบวนการรับรู้สีกเจ็บปวดที่มาจากหลอดเลือดและอวัยวะอื่นๆ ในโพรงกะโหลกศีรษะ

นอกจากผลต่อเซลล์ประสาทแล้วซีโร โดนิยังมีผลต่อความตึงตัวของหลอดเลือด โดยอาจทำให้หลอดเลือดหดตัวหรือคลายตัวทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและความตึงตัวของหลอดเลือด ฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการคลายตัวเชื่อว่าเกิดจากผลโดยตรงต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดเอง และโดยอ้อมก็ผ่านกระบวนการที่ต้องอาศัยเซลล์บุหลอดเลือด รวมทั้งเป็นผลจากการยับยั้งการหลั่งนอร์เอเดรนาลีน ส่วนผลที่กระตุ้นให้เกิดการหดตัวเกิดจากการกระตุ้นตัวรับชนิด 5-HT_{1d} หรือ 5-HT₂ ในหลอดเลือด (Ferrari and Saxena, 1993)

ความสัมพันธ์ระหว่างซีโร โดนิและการเกิดโรคปวดศีรษะไมเกรนเป็นข้อสังเกตที่พบมากกว่า 30 ปี โดยเริ่มจากการศึกษาของ Sicuteri และคณะในปี 1961 ซึ่งพบว่าระหว่างที่ผู้ป่วยไมเกรนเกิดอาการปวดศีรษะจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่สำคัญของซีโร โดนิ (Sicuteri et al., 1961) การเพิ่มขึ้นของระดับของสารดังกล่าวเกิดร่วมกับการลดลงของปริมาณของซีโร โดนิในเซลล์เกล็ดเลือด (Anthony et al., 1969) และการเพิ่มขึ้นของระดับซีโร โดนิในพลาสมา (Ferrari et al., 1989) จากการศึกษาในระยะหลังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในระดับซีโร โดนิและอนุพันธ์ในเซลล์เกล็ดเลือดมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับระดับในสมองและน้ำไขสันหลัง (Kovacs et al., 1989) จากการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าในระยะปวดศีรษะไมเกรน ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพบางประการที่กระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยซีโร โดนิออกจากตำแหน่งเก็บ (storage site) ซึ่งการปลดปล่อยซีโร โดนินี้จะมีส่วนสำคัญในพยาธิกำเนิดของภาวะปวดศีรษะ จากการศึกษาในระยะหลังพบว่า การลดต่ำลงของปริมาณซีโร โดนิมีความสัมพันธ์กับความถี่ของการเกิดอาการปวดศีรษะ (Srikiatkachorn and Anthony, 1996a) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยไมเกรนมีความผิดปกติอื่นๆ ของระบบซีโร โดนิ เช่น ในเซลล์เกล็ดเลือดของผู้ป่วยไมเกรนมีความสามารถในการเก็บกลับ (uptake) ซีโร โดนิต่างจากกลุ่มควบคุม โดยมีค่าที่ Michaelis-Menten (Km) สูงกว่าคนปกติ (Hannah et al., 1991) รวมทั้งมีการลดต่ำลงของการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ซึ่งทำหน้าที่สลาย ซีโร โดนิ (Ferrari et al., 1989)

ข้อมูลทางคลินิกได้ยืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่างซีโร โดนิและการเกิดโรคปวดศีรษะ ไมเกรน จากการสังเกตอาการของผู้ป่วยที่ได้รับยา reserpine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเก็บกลับของซีโร โดนิ พบว่าผู้ป่วยเกิดอาการปวดศีรษะที่มีลักษณะเดียวกับอาการปวดศีรษะไมเกรน และอาการดังกล่าวสามารถบำบัดได้โดยการให้ซีโร โดนิ (Kimball et al., 1960) นอกจากนี้ยาที่มีฤทธิ์ดีในการบำบัดหรือป้องกันอาการปวดศีรษะไมเกรนจำนวนมากออกฤทธิ์โดยผ่านตัวรับซีโร โดนิ กล่าวคือ ยาในกลุ่ม 5HT₁ agonist ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นตัวรับซีโร โดนิชนิด 5HT₁ เช่น sumatriptan หรือ 311C90 มีคุณสมบัติในการลดอาการปวดศีรษะ ในขณะที่ยาในกลุ่ม 5HT₂ antagonist ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้ง การทำงานของตัวรับซีโร โดนิชนิด 5HT₂ ให้ผลดีในการป้องกันอาการปวดศีรษะ (Ferrari and Saxena, 1993) จากการศึกษาในระยะหลังบ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงของตัวรับซีโร โดนิมีความสัมพันธ์กับความถี่ของอาการปวดศีรษะ โดยที่อาการปวดศีรษะจะลดลงเมื่อปริมาณตัวรับ 5HT₂ ลดลง (Govitrapong et al., 1992) และความถี่สูงขึ้นเมื่อปริมาณตัวรับสูงขึ้น (Srikiatkachorn et al., 1994 ; Srikiatkachorn and Anthony, 1996b)

จากข้อมูลทางคลินิกและการศึกษาทางห้องปฏิบัติการดังที่ได้กล่าวข้างต้น ต่างยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงและบทบาทของซีโร โดนิในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน ความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเป็นผลของความผิดปกติของซีโร โดนิที่มีต่อระบบการควบคุมหลอดเลือด, ระบบการควบคุมการรับความเจ็บปวดหรือทั้งสองระบบ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ความสัมพันธ์ระหว่างซีโรโตนินและไนตริกออกไซด์

การทำงานของสารสื่อประสาททั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ตัวอย่างเช่น การออกฤทธิ์ของซีโรโตนินเพื่อกระตุ้นให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กเป็นกลไกที่ต้องอาศัยและไนตริกออกไซด์จากเซลล์เอนโดเธลิยม (Bruning et al., 1993) ในขณะที่ไนตริกออกไซด์เองมีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดใหญ่ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยซีโรโตนิน (Faraci and Heistad, 1992) การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงและการศึกษาใน synaptosome พบว่าไนตริกออกไซด์มีส่วนในการควบคุมการเก็บกลับ (reuptake) ของซีโรโตนิน (Miller and Hoffman, 1994 ; Pogun et al., 1994) สำหรับการศึกษาในสัตว์ (in vivo study) พบว่าไนตริกออกไซด์มีบทบาทในการควบคุมการปลดปล่อย (release) ของซีโรโตนินในสมองส่วน striatum (Guzman et al., 1994), ส่วน preoptic (Lorrain and Hull, 1993) ในทางการศึกษาได้มีการศึกษาถึงการกระจายของสารสื่อประสาททั้งสองในระบบประสาทส่วนกลาง จากการศึกษาของ Wotherspoon และคณะพบว่าในตำแหน่งของ nucleus raphe ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ซีโรโตนินที่สำคัญ มีใยประสาทที่มีเอนไซม์ NOS ซึ่งแสดงว่าไนตริกออกไซด์อาจมีส่วนในการควบคุมการทำงานของระบบซีโรโตนิน (Wotherspoon et al., 1994) เนื่องจากสารสื่อประสาททั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงในระบบใดระบบหนึ่งย่อมสามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของอีกระบบได้ จากการศึกษาของ Ito และคณะพบว่า การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์เป็นเวลานานสามารถทำให้หลอดเลือดมีความไวต่อซีโรโตนินมากกว่าปกติ (Ito et al., 1995) ซึ่งอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงในจำนวนหรือความสามารถในการเกาะจับของตัวรับ (Kodokami et al., 1996)

จากการศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าทั้งซีโรโตนินและไนตริกออกไซด์ซึ่งต่างมีบทบาทในการควบคุมการรับความเจ็บปวดและระบบการควบคุมหลอดเลือด กระบวนการทั้งสองเป็นกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคไมเกรน ดังนั้นความผิดปกติที่เกิดขึ้นต่อระบบซีโรโตนินหรือระบบไนตริกออกไซด์หรือความสัมพันธ์ในการทำงานของระบบดังกล่าวจึงน่าจะมีส่วนในพยาธิกำเนิดของภาวะนี้

สรุป: การศึกษาทั้งหมดข้างต้นบ่งชี้ว่า ซีโรโตนินและไนตริกออกไซด์เป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในระบบรับความเจ็บปวดและระบบการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือดในโพรงกะโหลกศีรษะ การเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาททั้งสองย่อมส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระบบการควบคุมหลอดเลือด เนื่องจากในปัจจุบันความสัมพันธ์ระหว่างสารสื่อประสาททั้งสองในพยาธิกำเนิดของอาการปวดศีรษะจากหลอดเลือดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คณะผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการวิจัยนี้ขึ้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าว ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทางพยาธิวิทยาเมื่อมีความผิดปกติของระบบทั้งสอง โดยใช้การเปลี่ยนแปลงในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ของเซลล์เอนโดเธลิยมในหลอดเลือดสมอง หลังจากรับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ตลอดจนศึกษาบทบาทของ NO ต่อการหลั่งของสารสื่อประสาทต่างๆ ในกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองเมื่อมีภาวะพร่องซีโรโตนิน และ/หรือเมื่อสัตว์ทดลองได้รับ nitric oxide synthase inhibitor

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงหลอดเลือดสมองในแบบจำลองโรคปวดศีรษะไมเกรน โดยการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ในภาวะปกติและในภาวะพร่องซีโรโตนิน
2. เพื่อศึกษาบทบาทของ NO ต่อกระบวนการรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง จากปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ในภาวะปกติและในภาวะพร่องซีโรโตนิน
3. เพื่อศึกษาบทบาทของ NO ในการควบคุมกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง

การดำเนินงานวิจัยประกอบด้วยการศึกษา 3 การศึกษา คือ

1. ศึกษาผลของการให้ nitric oxide synthase inhibitor ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมองในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ในหนูปกติ และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน
2. ศึกษาผลของการให้ nitric oxide synthase inhibitor ต่อการเปลี่ยนแปลง activity ของ brainstem neurons ที่รับผิดชอบต่อการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดในบริเวณศีรษะ (spinal neurons ในระดับ C1-C2) จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ในหนูปกติ และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน
3. ศึกษาบทบาทของ NO ต่อการหลั่งของสารสื่อประสาทต่างๆในกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองจากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ในหนูปกติ และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน

ระเบียบวิธีวิจัย และ ผลการศึกษาวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

เนื่องจากผลการศึกษาวิจัยต่าง ๆ บ่งชี้ว่าพยาธิกำเนิดของภาวะนี้ เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในระบบควบคุมความเจ็บปวดของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ (trigemino vascular nociceptive system) ซึ่งเป็นระบบที่ถูกกระตุ้นได้ทั้งการกระตุ้นผ่านระบบหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular system) และการกระตุ้นระบบรับความเจ็บปวดในบริเวณศีรษะ (trigeminal nociceptive system) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งสองระบบ ดังนี้

1. ระบบควบคุมความเจ็บปวดของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมองในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระบบรับความเจ็บปวดในบริเวณศีรษะ โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลง activity ของ brainstem neurons ที่รับผิดชอบต่อการส่งผ่านความรู้สึเจ็บปวดในบริเวณศีรษะ (trigemino cervical complex) โดยทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Fos ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการกระตุ้นของ neurons ซึ่งการที่ neurons ที่รับผิดชอบการส่งกระแสความรู้สึเจ็บปวดถูกกระตุ้นจะสามารถบ่งชี้ว่ามีการส่งผ่านความรู้สึเจ็บปวด (nociceptive transmission) ขึ้นไปยังสมองและจะถูกแปลผลเป็นความรู้สึเจ็บปวด

โดยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีการเตรียมสัตว์ทดลองดังนี้

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูพันธุ์ Wistar เพศผู้ แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

1. กลุ่มหนูควบคุม (Control)
2. กลุ่มหนูควบคุมที่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor (Control with L-NAME)
3. กลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน (Hyposerotonin)
4. กลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินที่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor (Hyposerotonin with L-NAME)

โดยกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะพร่องซีโรโตนิน โดยได้รับการฉีดสาร para-chlorophenylalanine (PCPA) ในความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว/กิโลกรัม เข้าในช่องท้อง เป็นเวลา 3 วันแล้วก่อนจะนำไปศึกษาทดลอง

และกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor จะได้รับ สาร L-NAME ในความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว/กิโลกรัม ผ่านทางหลอดเลือดหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression โดยได้รับสาร L-NAME หลังจากเกิดคลื่นไฟฟ้าบนผิวสมอง (Depolarization shift , DC shift) แล้ว 2 คลื่น

การศึกษาที่ 1 : ศึกษาผลของการให้ nitric oxide synthase inhibitor ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมองในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ในหนูปกติ และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโคติน

การเตรียมสัต์ทดลอง

โดยสัต์ทดลองทุกกลุ่มจะถูกนำมาทำให้สลบโดยใช้ pentobarbital ขนาด 60 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากสัต์สลบแล้วทำการเจาะคอและใส่ท่อช่วยหายใจ หลังจากนั้นทำการผ่าตัดเจาะกะโหลกศีรษะ (craniotomy) โดยเจาะบริเวณ parietal bone เพื่อวาง potassium chloride (3 mg) ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ cortical spreading depression

หลังจากวาง potassium chloride ลงบนผิวสมองเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เนื้อสมองในส่วน frontal cortex ของสัต์ทดลองทุกกลุ่ม จะถูกแยกออกมาเพื่อเตรียมศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตามขั้นตอนดังนี้ สัต์ทดลองจะถูกนำมาทำให้สลบโดยใช้ pentobarbital ขนาด 60 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากสัต์สลบแล้วเนื้อสมองในส่วน frontal cortex จะถูกแยกออกมาเพื่อเตรียมศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ชิ้นเนื้อ frontal cortex ที่ตัดออกมาจะถูกตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ขนาด 1x1 ตารางมิลลิเมตร ทำการแช่ชิ้นเนื้อทั้งหมดลงในสารละลาย 3% glutaraldehyde เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นชิ้นเนื้อจะถูกถ่วงลงในสารละลาย Osmium tetroxide จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อตัวอย่าง (dehydration) โดยการผ่าน alcohol ในความเข้มข้นต่างกันลงในชิ้นเนื้อตัวอย่าง (จาก 70% alcohol ถึง 100% alcohol) จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ปราศจากน้ำแล้วมาฝังในเบ้าพลาสติก (embedding mold) ด้วยสารละลายพลาสติก (epon 812) หลังจากนั้นตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 C เป็นเวลา 2 คืน นำบล็อกตัวอย่างมาตัดให้มีความหนา 1 μ m แล้วนำไปตรวจหาบริเวณที่มีเส้นเลือด arteriole และ capillary หลังจากนั้นทำการตัดตัวอย่างเฉพาะบริเวณที่เลือกไว้ โดยทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 80-90 nm ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดจะถูกวางบนตาข่ายทองแดงขนาดเล็ก (copper grid) แล้วจึงถูกนำไปย้อมด้วยสารละลายโลหะหนัก 2 ชนิด คือ uranyl acetate และ lead citrate หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดระหว่างสัต์ทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโคตินและกลุ่มควบคุม โดย parameter ที่ทำการศึกษาประกอบด้วยจำนวนของ microvilli, และ จำนวนและความหนาแน่นของ pinocytic vesicle

ผลการศึกษาวิจัย

1. ผลของภาวะพร่องซีโรโคตินต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมองหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

การศึกษาวิจัยในส่วนนี้ทำการศึกษาโครงสร้างของ endothelial cell ของหลอดเลือดสมอง ในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยทำการศึกษาใน หลอดเลือด arteriole และ capillary

ผลการทดลองพบว่าการถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression มีผลกระตุ้นต่อ หลอดเลือดสมองของสัต์ทดลอง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ endothelial cell ในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยพบว่า ในหลอดเลือด arteriole มีค่าเฉลี่ยของ microvilli เท่ากับ 14.7 ± 3.4 microvilli/หลอดเลือด และความหนาแน่นของ pinocytic vesicle เท่ากับ 29 ± 8 vesicle / ตารางไมโครเมตร ส่วน

ในหลอดเลือด capillary พบว่า ค่าเฉลี่ยของ microvilli มีค่าเท่ากับ 1.4 ± 1.3 microvilli/หลอดเลือด ความหนาแน่นของ pinocytic vesicle เท่ากับ 29 ± 10 vesicle / ตาราง

ผลการศึกษายังพบว่าในหนูที่มีภาวะพร่องซีโร โดนินมีการเปลี่ยนแปลงของ endothelial cell ของหลอดเลือดสมองหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression มากกว่าหนูที่มีซีโร โดนินปกติ โดยพบว่าในหนูที่มีภาวะพร่องซีโร โดนินหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression มีการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างของหลอดเลือด arteriole และ capillary อย่างชัดเจน ในหลอดเลือด arteriole พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวน microvilli ในกลุ่มที่มีภาวะพร่องซีโร โดนิน มีค่า 25.6 ± 5 microvilli/หลอดเลือด ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม (14.7 ± 5 microvilli/หลอดเลือด) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าของ pinocytic vesicle ในหนูทั้งสองกลุ่ม พบว่า pinocytic vesicle ในหนูกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโร โดนิน (41 ± 9 vesicle / ตารางไมโครเมตร) มากกว่าจำนวน pinocytic vesicle ของหนูกลุ่มควบคุม (29 ± 8 vesicle / ตารางไมโครเมตร)

ผลการศึกษาในหลอดเลือด capillary ให้ผลในทำนองเดียวกันกับการศึกษาในหลอดเลือด arteriole โดยพบว่าในหลอดเลือด capillary ของหนูที่มีภาวะพร่องซีโร โดนินมีค่าเฉลี่ยของจำนวน microvilli เท่ากับ 3.7 ± 1.3 microvilli /หลอดเลือด ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากกลุ่มปกติ (1.4 ± 1.3 microvilli /หลอดเลือด) และค่าของ pinocytic vesicle ที่พบในกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโร โดนิน (35 ± 10 vesicle / ตารางไมโครเมตร) มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม (29 ± 10 vesicle / ตารางไมโครเมตร) เช่นกัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1, 2 และภาพที่ 1

2. ผลของการให้ nitric oxide synthase inhibitor ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมอง หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ในหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนิน

ผลการศึกษาพบว่าการได้รับ L-NAME สามารถลดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมอง จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ในหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินได้ โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของ endothelial cell ของกลุ่มหนูที่ได้รับสาร L-NAME น้อยกว่าในกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ไม่ได้รับสาร โดยพบว่าในหลอดเลือด arteriole ของกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ได้รับสาร L-NAME มีค่าเฉลี่ยของจำนวน microvilli เท่ากับ 12.7 ± 6 microvilli/หลอดเลือด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ไม่ได้รับสาร L-NAME (25.6 ± 5 microvilli/หลอดเลือด) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าของ pinocytic vesicle ในหนูทั้งสองกลุ่ม พบว่า pinocytic vesicle ในหนูกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ได้รับสาร L-NAME (20 ± 8 vesicle / ตารางไมโครเมตร) น้อยกว่าจำนวน pinocytic vesicle ของหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ไม่ได้รับสาร L-NAME (41 ± 10 vesicle / ตารางไมโครเมตร)

ผลการศึกษาในหลอดเลือด capillary ให้ผลเช่นเดียวกันกับการศึกษาในหลอดเลือด arteriole โดยพบว่าในหลอดเลือด capillary ของหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ได้รับสาร L-NAME มีการเปลี่ยนแปลงของ endothelial cell ของหลอดเลือดสมองหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression น้อยกว่าหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ไม่ได้รับสาร L-NAME ดังผลแสดงในตารางที่ 1, 2 และภาพที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1. แสดงค่าเฉลี่ยของ microvilli ในหลอดเลือด arteriole และ capillaries ในกลุ่มหนูทดลองทั้งหมด หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

Group	Number of microvilli / vessel	
	Capillary	Arteriole
Control	1.4 ± 1.3	14.7 ± 5
Control with L-NAME	0.9 ± 1	16.6 ± 4
Hyposerotonin	$3.7 \pm 1.3^*$	$25.6 \pm 5^*$
Hyposerotonin with L-NAME	$1.2 \pm 1.3^\#$	$12.7 \pm 5^\#$

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ($p < 0.005$)

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Hypo-serotonin ($p < 0.005$)

ตารางที่ 2. แสดงค่าเฉลี่ยของ ความหนาแน่นของ pinocytic vesicle ในหลอดเลือด arteriole และ capillaries ในในกลุ่มหนูทดลองทั้งหมดหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

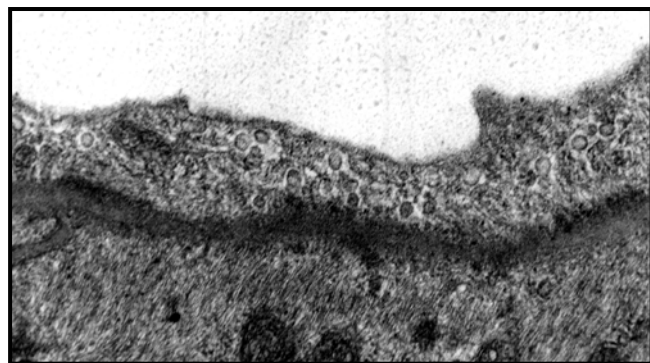
Group	Number of pinocytic vesicles/ μm^2	
	Capillary	Arteriole
Control	29 ± 10	29 ± 8
Control with L-NAME	25 ± 8	22 ± 10
Hyposerotonin	35 ± 10	$41 \pm 9^*$
Hyposerotonin with L-NAME	$17 \pm 7^\#$	$20 \pm 8^\#$

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ($p < 0.005$)

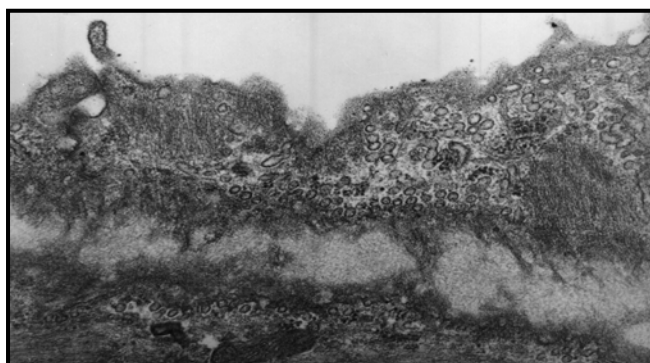
แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Hypo-serotonin ($p < 0.005$)



A



B

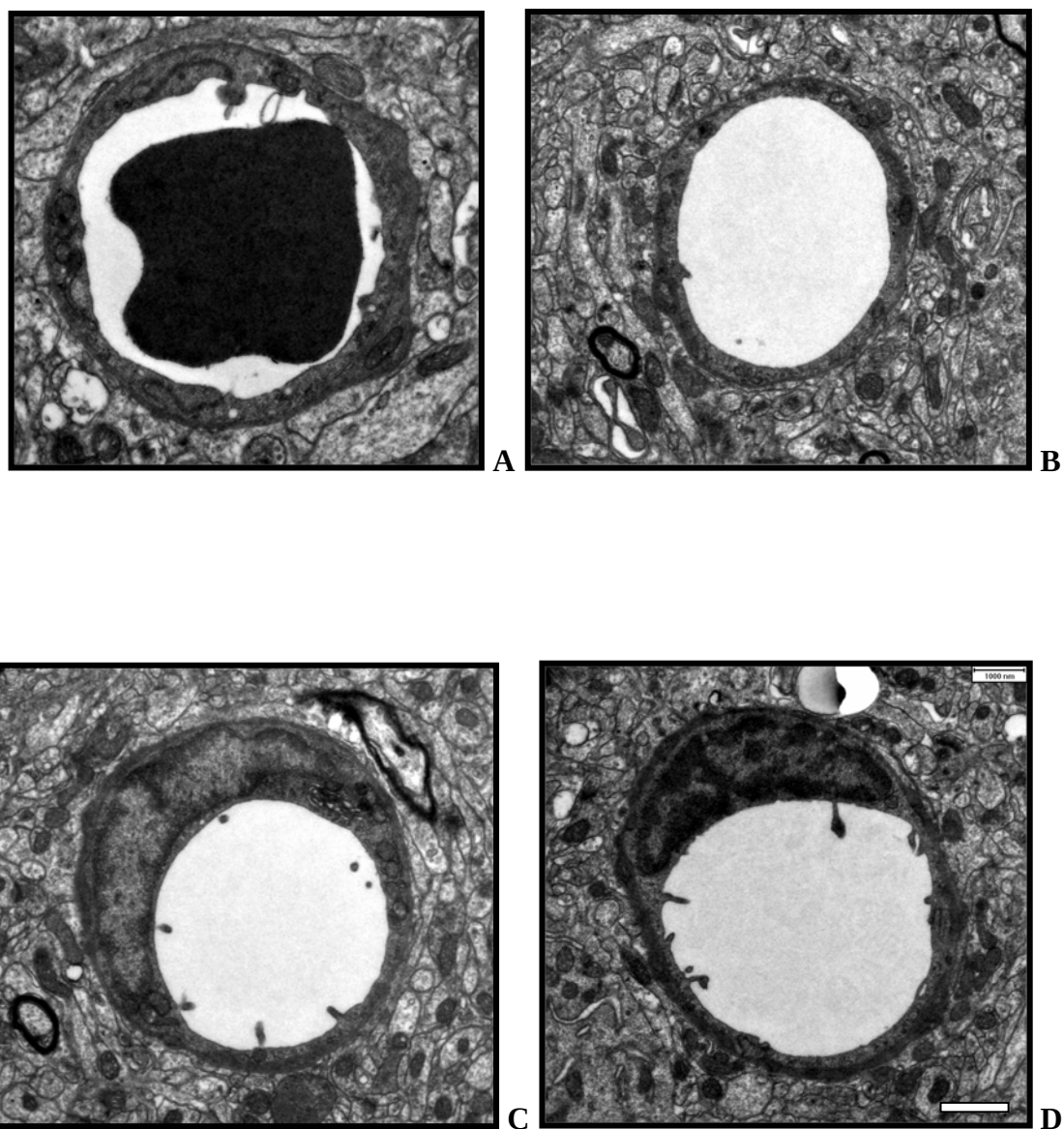


C



D

ภาพที่ 1. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างของหลอดเลือด arteriole ในหนูปกติ (A) หนูปกติที่ได้รับ สาร L-NAME (B) หนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน (C) และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน ร่วมกับการได้รับสาร L-NAME (D) หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression. Bar = 200 nm.



ภาพที่ 2. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงโครงสร้างของหลอดเลือด capillary ในหนูปกติ(A)หนูปกติที่ได้รับ สาร L-NAME(B) หนูที่มีภาวะพร่องซีโรไตติน(C) และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรไตตินร่วมกับได้รับสาร L-NAME (D)หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression. Bar = 1000 nm.

การศึกษาที่ 2 : ศึกษาผลของการให้ **nitric oxide synthase inhibitor** ต่อการเปลี่ยนแปลง **activity** ของ **brainstem neurons** ที่รับผิดชอบต่อการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดในบริเวณศีรษะ (**spinal neurons** ในระดับ **C1-C2**) จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ **cortical spreading depression** ในหนูปกติ และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หลังจากวาง potassium chloride ลงบนผิวสมองเพื่อกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หนูทดลองทุกกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหนูควบคุมและกลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินที่ได้รับ และไม่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor จะถูกฉีดด้วย pentobarbital ขนาด overdose โดยฉีดเข้าช่องท้องจากนั้นสัตว์ทดลองทุกตัวจะถูกนำมาผ่านกระบวนการเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ NOS และ โปรตีน fos ต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ NOS และ โปรตีน fos

หนูทดลองทุกตัวจะถูก perfuse ด้วย PBS ปริมาตรทั้งหมด 250 มิลลิลิตร โคนจะทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลอง ตั้งแต่ ระดับช่องท้องจนถึงหัวใจ จะให้เข็มแทงผ่านตั้งแต่ส่วนยอดหัวใจ ผ่านหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) แล้วจึงผ่าน PBS ลงในท้องข้าง ที่ต่อกับเข็มที่แทงไว้แล้ว ทำการ perfuse สัตว์ทดลองจนกระทั่ง PBS หมด จึงทำการ perfuse ต่อด้วย 4% paraformaldehyde ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผ่าตัดเปิดกะโหลกศีรษะ แยกฝากระดูกสมองออก ตัดแยกสมองและไขสันหลังส่วนคอ (cervical spinal cord) นำชิ้นเนื้อที่ได้มาทำการ postfixation โดยการแช่ใน 0.1 M PBS เก็บไว้ข้ามคืนในอุณหภูมิ 4°C จากนั้นจึงนำมาแช่ใน 30% sucrose ใน 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4°C) แช่จนจนกระทั่งชิ้นเนื้อจมลงใน buffer เพื่อ cryoprotection เมื่อชิ้นเนื้อจมลงแล้วจึงนำมาตัดโดยใช้เครื่อง cryostat (Microm HM 50 N) โดยตั้งความหนาของ slide ที่ 30 micrometer เก็บชิ้นเนื้อที่ตัดได้ไว้ใน 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4°C) เพื่อเตรียมย้อม ด้วย immunohistochemistry โดยวิธี free floating method

การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ NOS และ โปรตีน fos

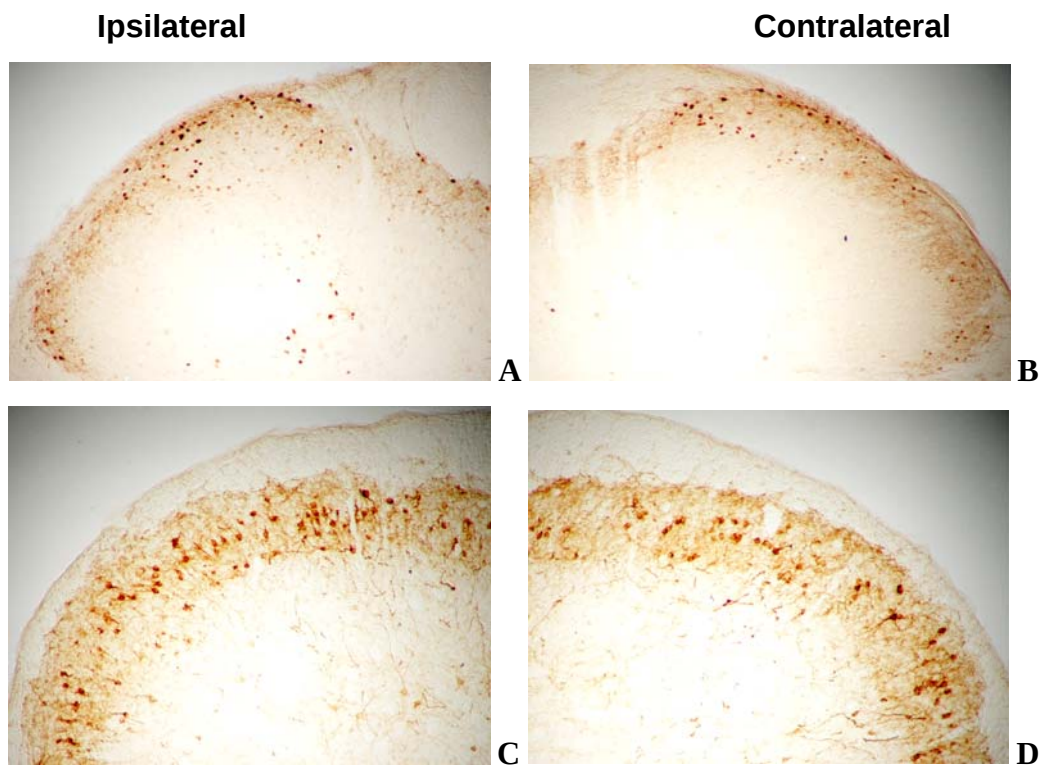
นำชิ้นเนื้อที่ตัดได้มาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำมาแช่ใน PBS ที่เติม 1% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อลด endogenous peroxidase จากนั้นนำชิ้นเนื้อมา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS+ 1% BSA + 0.3% Triton X 100) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อลด non-specific binding แล้วจึงนำมา incubate กับ specific primary antibody (rabbit anti-cfos antiserum and rabbit anti NOS antiserum, dilution 1:1000) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นเนื้อทำปฏิกิริยากับ primary antibody จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาขึ้นแล้วมาล้างด้วย PBS-B (PBS + 0.25% BSA + 0.1% Triton X-100) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2 กับ biotinylated mouse anti- rabbit IgG (dilution 1:200) ใน PBS-B เป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS นำชิ้นเนื้อไปทำให้เกิดสีโดยวิธี ABC complex ด้วย ABC-streptavidin horseradish peroxidase complex (dilution 1:250) ใน PBS แช่ชิ้นเนื้อเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นล้างทิ้ง แล้วนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปทำปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายโดยแช่ในสารละลาย tris-HCL buffer ที่เติม 0.25% diaminobenzidine (DAB) และ 0.01% hydrogen peroxide เป็นเวลา 7 นาที นำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วมาล้างและติดบน slide และปิดด้วย cover slip นำ slide ที่ได้มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มี NOS-

like immunoreactivity (NOS-IR) จะติดสีน้ำตาลเข้มในบริเวณ cytoplasm ส่วนเซลล์ที่มี fos-like immunoreactivity (fos-IR) จะติดสีน้ำตาลเข้มในบริเวณ nucleus ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของกลุ่มเซลล์ที่มี NOS-IR และกลุ่มเซลล์ที่มี fos-IR และทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งสองชนิดเปรียบเทียบระหว่างหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินและกลุ่มหนูปกติ

ผลการศึกษา

1. ผลของภาวะพร่องซีโรโตนินต่อการเปลี่ยนแปลง activity ของ brainstem neurons ที่รับผิดชอบต่อการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดในบริเวณสัรษะ (spinal neurons ในระดับ C1-C2) จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression

ผลการทดลองพบว่าการกระตุ้นให้สมองใหญ่เกิดปรากฏการณ์ cortical spreading depression สามารถกระตุ้นต่อระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง โดยพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ เอนไซม์ NOS และจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos ในบริเวณ Laminar I และ II ใน dorsal horn ของไขสันหลังในระดับ C1-C2 (ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่รับผิดชอบต่อส่งกระแสประสาทขึ้นไปสู่สมองเมื่อมีการกระตุ้นบริเวณใบหน้าและศีรษะ) ในหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติบ่งชี้ว่ามีการกระตุ้นระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองจากปรากฏการณ์ cortical spreading depression และเมื่อทำการศึกษาในกลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ โปรตีน fos ในบริเวณ Laminar I และ II ของชั้นเนื้อไขสันหลังในระดับ C1-C2 ในบริเวณ dorsal horn ของช้างที่ถูกกระตุ้นในกลุ่มที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน มีค่าเท่ากับ 25 ± 4 เซลล์ และ 14 ± 5 เซลล์ในช้างที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม (20 ± 5 และ 11 ± 3 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ในบริเวณ Laminar I และ II ใน ชั้นเนื้อไขสันหลังในระดับ C1-C2 ในกลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินมีจำนวนมากกว่ากลุ่มหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ในกลุ่มที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินเท่ากับ 32 ± 5 เซลล์ และ 23 ± 4 เซลล์ ในช้างที่ได้รับและไม่ได้รับการกระตุ้นตามลำดับซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม (25 ± 5 และ 16 ± 8 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3-4 และภาพที่ 3



ภาพที่ 3. ภาพแสดงเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos (A,B) และ เอนไซม์ NOS (C,D) ในบริเวณ Laminar I และ II ของชั้นเนื้อไขสันหลังของหนูปกติ(A) ในช่วงที่ถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression (Ipsilateral) และช่วงที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (Contralateral)

ตารางที่ 3. แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos ในบริเวณ Laminar I และ II ใน ชิ้นเนื้อไขสันหลังในระดับ C1-C2 ในหนูปกติเปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโทนินหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

Group	Ipsilateral	Contralateral
Control	20 $\pm$ 2	12 $\pm$ 4
Hypo-serotonin	25 $\pm$ 4*	14 $\pm$ 5*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ($p < 0.005$)

ตารางที่ 4. แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ในบริเวณ Laminar I และ II ใน ชิ้นเนื้อไขสันหลังในระดับ C1-C2 ในหนูปกติเปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโทนินหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

Group	Ipsilateral	Contralateral
Control	27 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2
Hypo-serotonin	32 $\pm$ 5*	23 $\pm$ 4*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ($p < 0.005$)

2. ผลของ nitric oxide synthase inhibitor ต่อการเปลี่ยนแปลง activity ของ brainstem neurons ที่รับผิดชอบต่อการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดในบริเวณศีรษะ (spinal neurons ในระดับ C1-C2) จากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ในหนูที่มีภาวะพร่อง ซีโร โดนิน

ผลจากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการศึกษาในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสารยับยั้งการสร้าง NO (nitric oxide synthase inhibitor) โดยฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำของสัตว์ทดลอง พบว่าการได้รับ สาร nitric oxide synthase inhibitor สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ โปรตีน fos ในบริเวณ Laminar I และ II ใน dorsal horn ของไขสันหลังในระดับ C1-C2 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับจำนวนที่พบในหนูกลุ่มปกติที่ไม่ได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor โดยพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ โปรตีน fos ในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสารยับยั้งการสร้าง NO ในช่วงที่ได้รับการกระตุ้นเท่ากับ 15 ± 4 เซลล์ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (20 ± 5 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) บ่งชี้ว่าการยับยั้งการสร้าง NO สามารถบรรเทา/ยับยั้งการกระตุ้นระบบรับความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองจากปรากฏการณ์ cortical spreading depression ได้ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 4

นอกจากนั้นผลการศึกษาในกลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโดนิน พบว่าการได้รับ L-NAME สามารถลดการกระตุ้นต่อ brainstem neurons จากปรากฏการณ์ cortical spreading depression ลงได้โดยพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS และจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos ในบริเวณ Laminar I และ II ใน dorsal horn ของไขสันหลังในระดับ C1-C2 ในกลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินร่วมกับได้รับสาร L-NAME มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินที่ไม่ได้รับสาร L-NAME ดังผลการทดลองแสดงใน ตารางที่ 5 และภาพที่ 4

ตารางที่ 5. แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos ในบริเวณ Laminar I และ II ใน ชิ้นเนื้อไขสันหลังในระดับ C1-C2 ในหนูปกติเปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

Group	Ipsilateral	Contralateral
Control	20 $\pm$ 5	11 $\pm$ 3
Control with L-NAME	16 $\pm$ 4*	10 $\pm$ 3*
Hypo-serotonin	25 $\pm$ 4*	14 $\pm$ 5*
Hypo-serotonin with L-NAME	19 $\pm$ 4 [#]	12 $\pm$ 3

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control (p < 0.005)

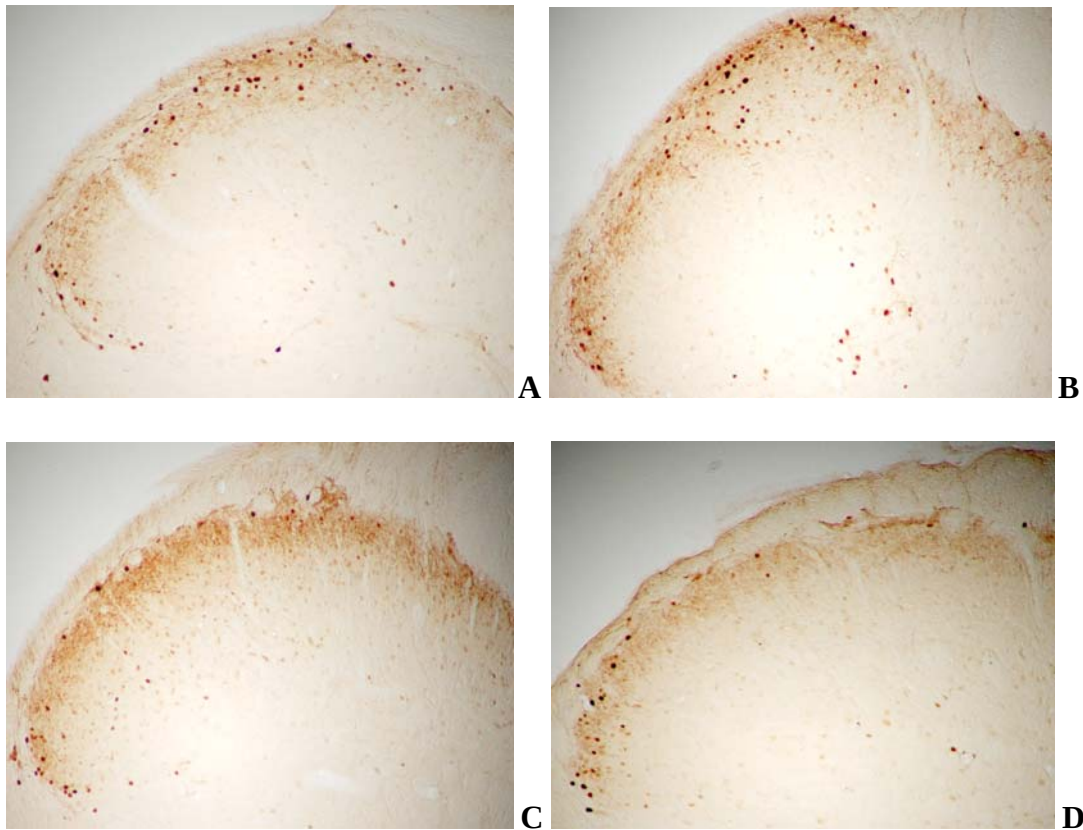
แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Hypo-serotonin (p < 0.005)

ตารางที่ 6. แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ในบริเวณ Laminar I และ II ใน ชิ้นเนื้อไขสันหลังในระดับ C1-C2 ในหนูปกติเปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินหลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

Group	Ipsilateral	Contralateral
Control	27 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2
Control with L-NAME	20 $\pm$ 4*	14 $\pm$ 3
Hypo-serotonin	32 $\pm$ 5*	23 $\pm$ 4*
Hypo-serotonin with L-NAME	22 $\pm$ 2 [#]	16 $\pm$ 3 [#]

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control (p < 0.005)

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Hypo-serotonin (p < 0.005)



ภาพที่ 4. ภาพแสดงเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos ในบริเวณ Laminar I และ II ในชิ้นเนื้อไขสันหลัง หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression ของหนูปกติ(A,C) เปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพร่องซีโร ไตบิน (B,D) โดยแสดงเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร Nitric oxide synthase inhibitor(A,B) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Nitric oxide synthase inhibitor (C,D)

การศึกษาที่ 3 : ศึกษาบทบาทของ NO ต่อการหลั่งของสารสื่อประสาทต่าง ๆ ในกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองจากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression ในหนูปกติ และหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโดนิน

การเตรียมสัต์ว์ทดลองและเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน fos

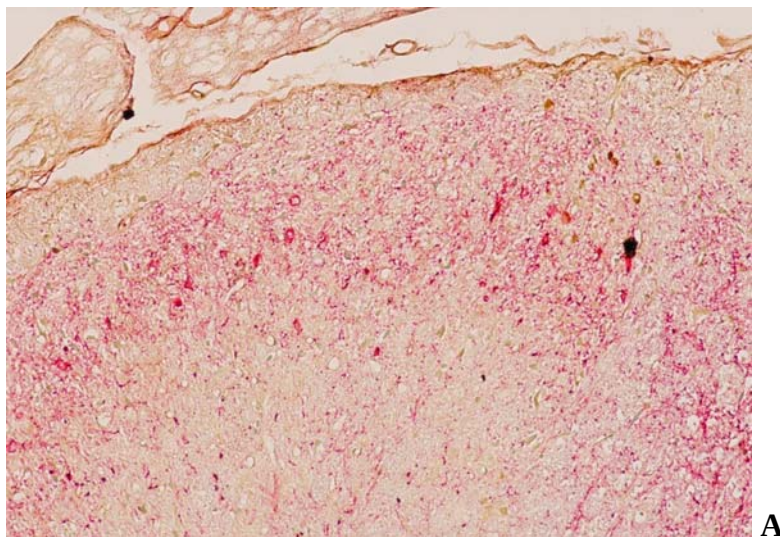
ทำการเตรียมสัต์ว์ทดลองและเตรียมชิ้นเนื้อเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 2 แต่ในการศึกษานี้ทำการตัดชิ้นเนื้อโดยใช้เครื่อง cryostat (Microm HM 50 N) ทำการตัด โดยตั้งความหนาของ ชิ้นเนื้อ ที่ 8 micrometer เก็บชิ้นเนื้อที่ตัดได้วางบนสไลด์แก้ว เก็บไว้ใน ตู้เย็น (อุณหภูมิ 4°C) เพื่อเตรียมซ่อม ด้วยวิธี immunohistochemistr ต่อไป

3.1 การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน fos

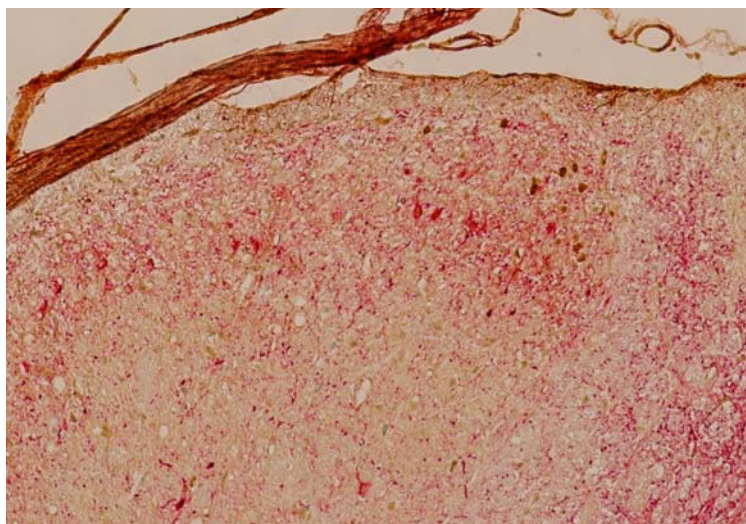
นำสไลด์ชิ้นเนื้อที่ต้องการซ่อม double staining มาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำมาแช่ใน PBS ที่เติม 1% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อลด endogenous peoxidase จากนั้นนำชิ้นเนื้อมา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS+ 1% BSA + 0.3% Triton X 100) เป็นเวลา 20 นาที เพื่อลด non-specific binding แล้วจึงนำมา incubate กับ rabbit anti-c fos antiserum ใน dilution 1:500) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นเนื้อทำปฏิกิริยากับ primary antibody จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาขึ้นคั่นแล้วมาล้างด้วย PBS-B (PBS + 0.25% BSA + 0.1% Triton X-100) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ Envision goat anti rabbit HRP เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วย PBS นำชิ้นเนื้อไปทำให้เกิดสีโดยนำไปทำปฏิกิริยากับ tris-HCL buffer ที่เติม 0.25% diaminobenzidine (DAB) และ 0.01% hydrogen peroxide เป็นเวลา 7 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วมาล้างด้วย Dako Cytomation doublestaining block เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที จากนั้นนำชิ้นเนื้อมา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS+ 1% BSA + 0.3% Triton X 100) เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำมา incubate กับ mouse anti NOS antiserum ใน dilution 1:500) แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ Envision goat anti mouseAP เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS ก่อนที่จะนำชิ้นเนื้อไปทำให้เกิดสีโดยนำไปทำปฏิกิริยากับ fast red เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการซ่อมทุกขั้นตอนแล้ว นำสไลด์ชิ้นเนื้อ ผ่านกระบวนการ dehydrate แล้วจึง ปิดด้วย cover slip นำ slide ที่ได้มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เซลล์ที่มี NOS-like immunoreactivity (NOS-IR) จะติดสีแดงเข้มในบริเวณ cytoplasm ส่วนเซลล์ที่มี fos-like immunoreactivity (fos-IR) จะติดสีน้ำตาลเข้มในบริเวณ nucleus ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของกลุ่มเซลล์ที่มี NOS-IR และกลุ่มเซลล์ที่มี fos-IR และทำการเปรียบเทียบระหว่างหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโดนินและกลุ่มหนูปกติ

ผลการศึกษา

จากการศึกษาในชิ้นเนื้อไขสันหลังระดับ C1-C2 ทั้งในกลุ่มหนูปกติ และในกลุ่มหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโคตินพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos นั้นอยู่ร่วมกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS โดยตรวจพบว่ามีการกระจายตัวของเซลล์ทั้งสองชนิดในบริเวณของ lamina I และ II (ภาพที่ 5) โดยพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ fos โปรตีนมักจะอยู่ร่วมกับกลุ่มของเซลล์และหรือแขนงของเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS เสมอ (ภาพที่ 6) โดยจากการศึกษาตัวอย่างในหนูทุกกลุ่มพบการกระจายตัวร่วมกันของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS และเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos ในรูปแบบที่เหมือนกันทุกกลุ่ม

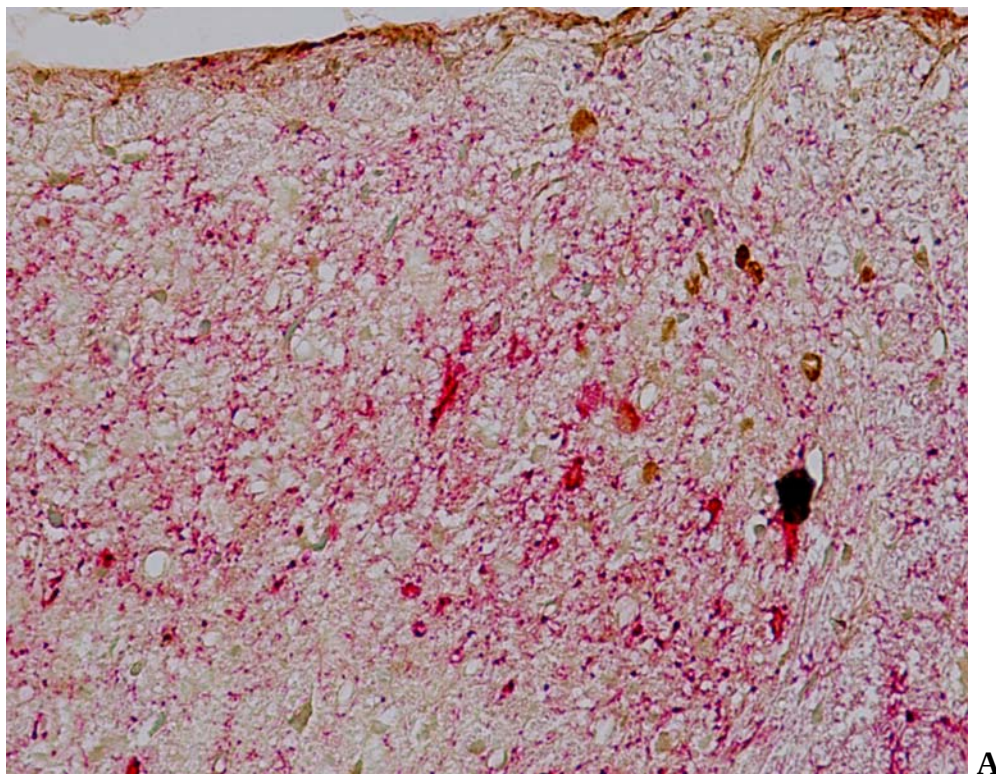


A

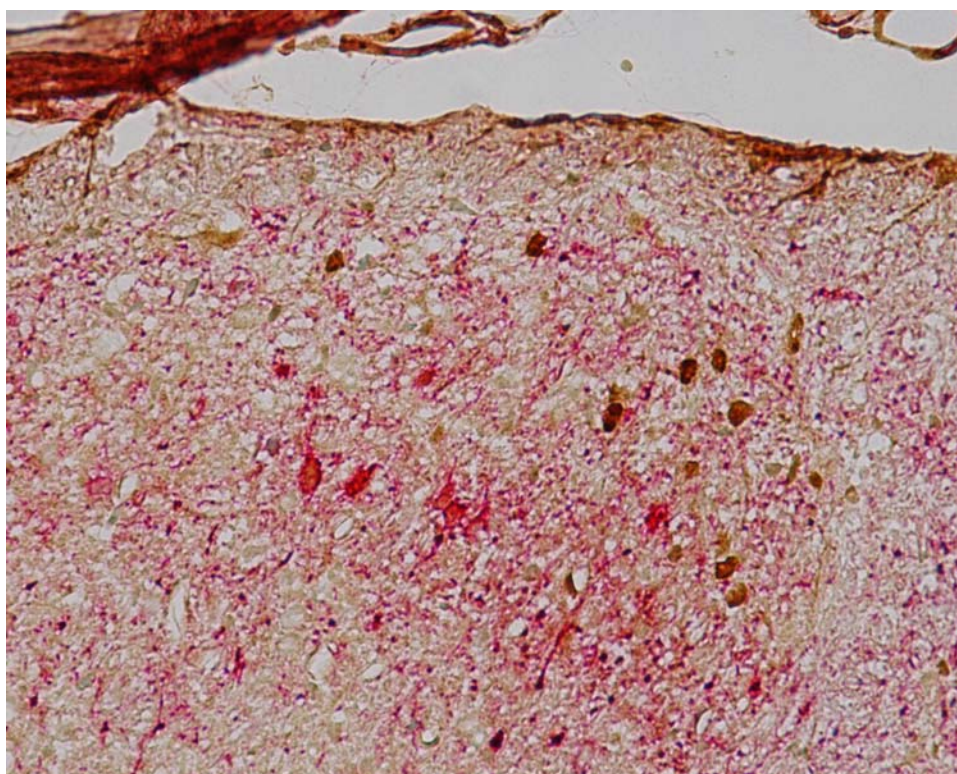


B

ภาพที่ 5. ภาพแสดงเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos อยู่ร่วมกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NOS ในบริเวณ Laminar I และ II ในชิ้นเนื้อไขสันหลังของหนูปกติ(A) เปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโคติน (B)หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression



A



B

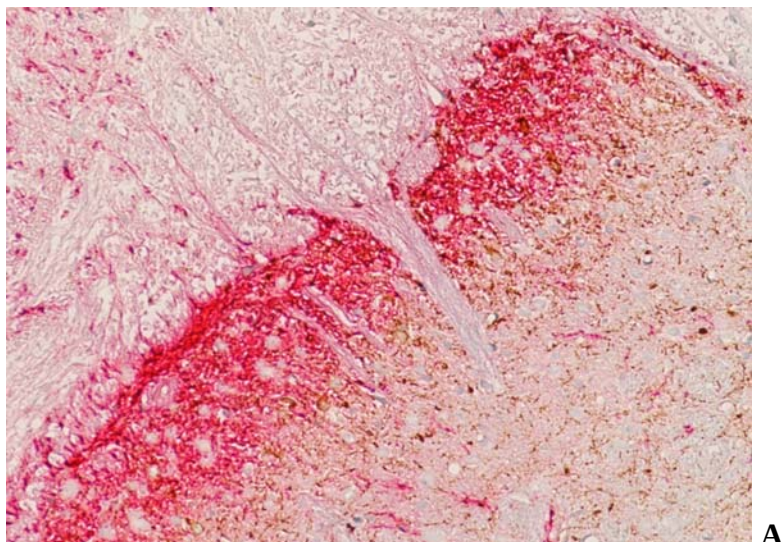
ภาพที่ 6. ภาพแสดงการกระจายตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos อยู่ระหว่างเซลล์ และแขนงของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NOS ในชั้นเนื้อไขสันหลังของหนูปกติ (A) และการกระจายตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน fos หนูที่มีภาวะพร่องซีโรโตนิน (B) ซึ่งมีการกระจายตัวที่เหมือนหนูปกติ

3.2 การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน CGRP

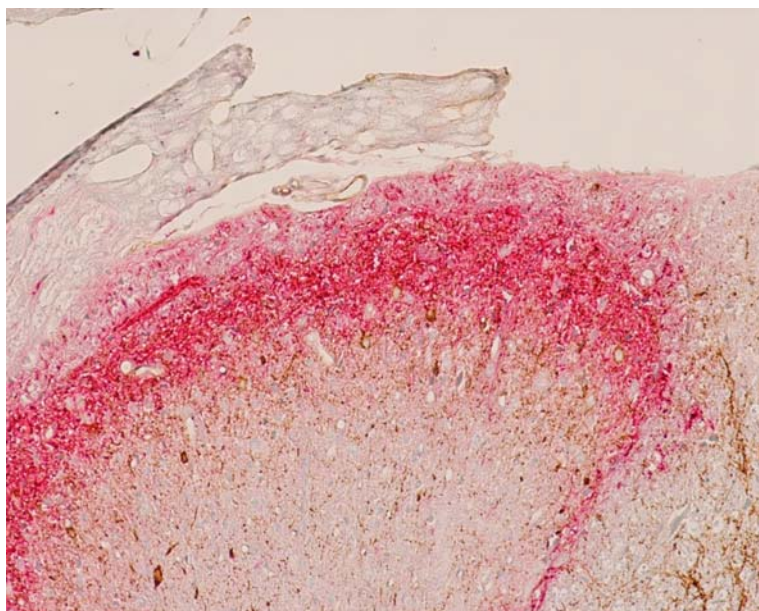
นำสไลด์ชิ้นเนื้อที่ต้องการย้อม double staining มาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำมาแช่ใน PBS ที่เติม 1% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อลด endogenous peroxidase จากนั้นนำชิ้นเนื้อมา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS+ 1% BSA + 0.3% Triton X 100) เป็นเวลา 20 นาที เพื่อลด non-specific binding แล้วจึงนำมา incubate กับ rabbit anti- NOS antiserum ใน dilution 1:500) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นเนื้อทำปฏิกิริยากับ primary antibody จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาขึ้นต้นแล้วมาล้างด้วย PBS-B (PBS + 0.25% BSA + 0.1% Triton X-100) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ Envision goat anti rabbit HRP เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วย PBS นำชิ้นเนื้อไปทำให้เกิดสีโดยนำไปทำปฏิกิริยากับ tris-HCL buffer ที่เติม 0.25% diaminobenzidine (DAB) และ 0.01% hydrogen peroxide เป็นเวลา 7 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วมาล้างด้วย Dako Cytomation doublestaining block เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที จากนั้นนำชิ้นเนื้อมา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS+ 1% BSA + 0.3% Triton X 100) เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำมา incubate กับ mouse anti- CGRP antiserum ใน dilution 1:500) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นเนื้อทำปฏิกิริยากับ primary antibody แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ Envision goat anti mouse AP เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS ก่อนที่จะนำชิ้นเนื้อไปทำให้เกิดสีโดยนำไปทำปฏิกิริยากับ fast red เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย้อมทุกขั้นตอนแล้ว นำสไลด์ชิ้นเนื้อ ผ่านกระบวนการ dehydrate แล้วจึงปิดด้วย cover slip นำ slide ที่ได้มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เซลล์ที่มี NOS-like immunoreactivity (NOS-IR) จะติดสีน้ำตาลเข้มในบริเวณ cytoplasm ส่วนเซลล์ที่มี CGRP-like immunoreactivity (CGRP-IR) จะติดสีแดงเข้มในบริเวณ cytoplasm ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของกลุ่มเซลล์ที่มี NOS-IR และกลุ่มเซลล์ที่มี fos-IR และทำการเปรียบเทียบระหว่างหนุททดลองที่มีภาวะพร่องซีโรโตนินและกลุ่มหนูปกติ

ผลการศึกษา

จากการศึกษาในชิ้นเนื้อไขสันหลังระดับ C1-C2 พบว่าในทุกกลุ่มการทดลองตรวจพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS นั้นอยู่ร่วมกับเซลล์ และปลายประสาทที่มีการแสดงออกของโปรตีน CGRP โดยตรวจพบว่าการกระจายตัวของเซลล์ทั้งสองชนิดในบริเวณของ lamina I และ II (ภาพที่ 7) โดยพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS จะอยู่ในกลุ่มของเซลล์และหรือแขนงของเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ CGRP เสมอ (ภาพที่ 8) โดยจากการศึกษาตัวอย่างในหนุททุกกลุ่มพบการกระจายตัวร่วมกันของเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ NOS และเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CGRP ในรูปแบบที่เหมือนกันทุกกลุ่ม

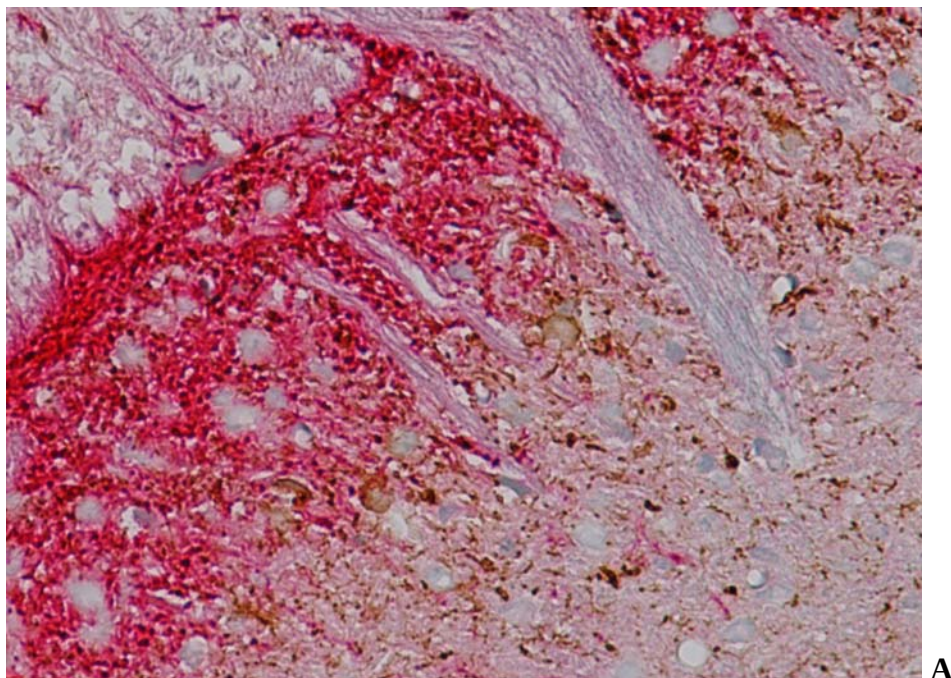


A

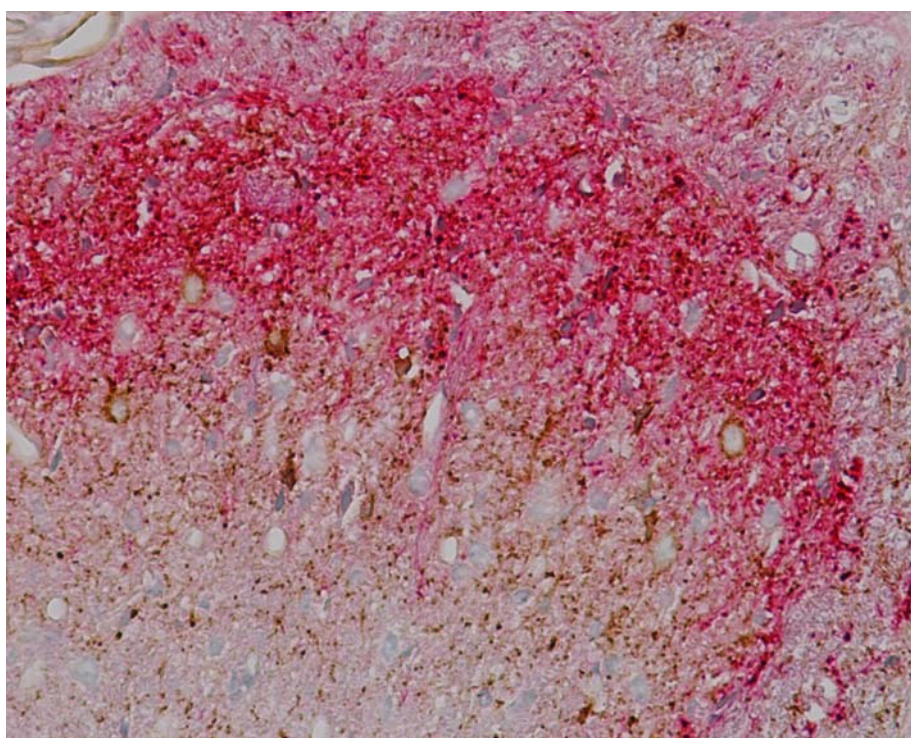


B

ภาพที่ 7. ภาพแสดงเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CGRPอยู่ร่วมกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NOS ในบริเวณ Laminar I และ II ในชั้นเนื้อไขสันหลังของหนูปกติ(A) เปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพรองซีโรโตนิน (B)หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression



A



B

ภาพที่ 8. ภาพแสดงเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CGRPอยู่ร่วมกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NOS ในบริเวณ Laminar I และ II ในชั้นเนื้อไขสันหลังของหนูปกติ (A) เปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะพร่องซีโรโทนิน (B) หลังจากถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ Cortical Spreading Depression

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ในภาวะที่มีระดับซีโร โดโนนต่ำนั้นสามารถทำให้การกระตุ้นต่อระบบรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง โดยปรากฏการณ์คอร์ติคัลสเปรดดิ้ง ดีเพรสชัน มากขึ้นกว่าในกลุ่มหนูที่มีระดับซีโร โดโนนปกติ แต่เมื่อหนูในกลุ่มที่มีระดับซีโร โดโนนต่ำได้รับสาร nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) กลับพบว่าการกระตุ้นต่อระบบรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูซีโร โดโนนต่ำที่ไม่ได้รับ L-NAME

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ของซีโร โดโนนและ nitric oxide ซึ่งจัดเป็นสารสื่อประสาทที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองทั้งคู่ โดยที่ทีมงานวิจัยหลายงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าในการที่ผู้ป่วยมีภาวะปวดศีรษะไมเกรนนั้นมีระดับของซีโร โดโนนตลอดจนอนุพันธ์ของซีโร โดโนนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งรวมถึงผลการศึกษาในเกร็ดเลือดของคนไข้ไมเกรนที่พบว่าในขณะที่มีภาวะปวดศีรษะนั้นจำนวนเกร็ดเลือดที่บรรจุซีโร โดโนนมีจำนวนลดต่ำลง

นอกจากนั้นผลจากการศึกษาทางคลินิกยังพบว่า ในระหว่างที่คนไข้มีอาการปวดศีรษะนั้น เมื่อตรวจวัดระดับของซีโร โดโนนพบว่ามีความต่ำลง (Anthony และคณะ 1969 Ferrari และคณะ 1989) ซึ่งจากผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าการที่ระดับของซีโร โดโนนต่ำลงสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อปรากฏการณ์คอร์ติคัลสเปรดดิ้งดีเพรสชัน ในการกระตุ้นระบบรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองมากกว่าในกลุ่มหนูที่มีระดับของซีโร โดโนนปกติ โดยพบว่าการกระตุ้นต่อทั้งระบบหลอดเลือดสมองและระบบประสาท trigeminal ถูกกระตุ้นมากกว่าในกลุ่มควบคุม ในระบบหลอดเลือดการตรวจพบที่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวน pinocytic vesicle และจำนวนของ microvilli มากกว่าในกลุ่มหนูปกติที่ถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์คอร์ติคัลสเปรดดิ้ง ดีเพรสชัน เหมือนกัน การเพิ่มจำนวนของ pinocytic vesicle และ microvilli ของเอนโดทีเลียมเซลล์นี้สามารถบ่งชี้ถึง transendothelial transportation ได้ (Lossinsky และคณะ 1995 และ Anuntasethakul และคณะ 1999) ซึ่งจากผลการศึกษาที่น่าจะสรุปได้ว่าภาวะที่มีซีโร โดโนนต่ำกว่าปกตินั้นสามารถเหนี่ยวนำให้มีภาวะ transendothelial transportation ได้มากกว่าในกลุ่มหนูที่มีภาวะซีโร โดโนนปกติ โดยที่ปรากฏการณ์ transendothelial transportation นั้นเป็นปรากฏการณ์ที่ได้รับการตรวจพบจากการทดลองของ Moskowitz และคณะในปี 1993 ที่พบว่าการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์คอร์ติคัลสเปรดดิ้ง สามารถเหนี่ยวนำให้มีการ transendothelial transportation ได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะวิจัย (Srikiatkachorn และคณะ 1999) ที่พบว่าภาวะที่มีระดับซีโร โดโนนต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้การกระตุ้นด้วยการฉีด GTN มีผลต่อหลอดเลือดมากกว่าในหนูกลุ่มที่มีซีโร โดโนนปกติ

โดยผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในโมเดลของโรคปวดศีรษะไมเกรนอีกชนิดหนึ่งซึ่งคือการกระตุ้นระบบ trigeminovascular nociceptive system ด้วยการฉีดสาร NO-donor ให้แก่สัตว์ทดลองยังพบว่า ภาวะพร่องซีโร โดโนนโดยการได้รับสาร PCPA นั้นสามารถเพิ่มการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อการกระตุ้นด้วย NO-donor ได้ดี โดยพบว่าในกลุ่มหนูทดลองที่มีภาวะพร่องซีโร โดโนนมีจำนวนของ microvilli และ pinocytic vesicle ในเซลล์เอนโดทีเลียมมากกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากถูกกระตุ้นด้วย NO-donor ในความเข้มข้นเท่ากัน ผลการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่านอกจากภาวะซีโร โดโนนต่ำจะส่งผลต่อการตอบสนองของหลอดเลือดสมองสูงกว่ากลุ่มควบคุมแล้ว ยังแสดงให้เห็นชัดเจนว่ามีการส่งกระแสความรู้สึกเจ็บปวดขึ้นไปยังสมองมากกว่ากลุ่มควบคุมด้วยโดยใช้จำนวนของ Fos-IR เซลล์เป็นตัวบ่งชี้

ผลจากการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะวิจัยหลายคณะได้บ่งชี้ว่ามีความเกี่ยวข้องกันระหว่างสารไนตริกออกไซด์และซีโรไคโตนิน โดยผลจากการศึกษาของ Ramos และคณะพบว่าการลดระดับของซีโรไคโตนินในหนูแรกเกิดนั้นสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่ม activity ของ NOS ในสมองในหลายบริเวณ เช่น Striatum และ hippocampus (Ramos และคณะ 2002 และ Tagliaterra และคณะ 2003)

โดยผลจากการศึกษาของคณะวิจัยหลายคณะได้บ่งชี้ว่าเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของอนไซม์ NOS นั้นมีตำแหน่งที่อยู่ใกล้ชิดกับเซลล์ประสาทที่บรรจุสารซีโรไคโตนินในหลายบริเวณในระบบประสาทส่วนกลาง (Johnson และ Ma, 1993; Kuhn และ Arthur, 1997; Wotherspoon และคณะ 1994)

นอกจากนั้นยังมีผลงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ nitric oxide และซีโรไคโตนินโดยพบว่า nitric oxide นั้นมีบทบาทในการควบคุมระดับของสารสื่อประสาทต่างๆ ซึ่งรวมถึงสารสื่อประสาทซีโรไคโตนินด้วย (Calapai และคณะ 1999; Kaehler และคณะ 1999)

ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ของ NO และซีโรไคโตนินในกระบวนการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดในสมองได้ โดยพบว่า NO มีบทบาทสำคัญในกระบวนการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีซีโรไคโตนินต่ำลง จากการที่พบว่าในหนูที่มีระดับของซีโรไคโตนินต่ำเมื่อได้รับสารยับยั้งอนไซม์ที่สร้าง NO (NOS inhibitor; L-NAME) สามารถบรรเทา/ลดภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากการกระตุ้นด้วย CSD ลงได้ โดยผลของ L-NAME นั้นมีผลยับยั้งทั้งต่อการกระตุ้นต่อระบบหลอดเลือดสมอง และการกระตุ้นต่อระบบส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง จากการที่พบว่าหนูที่ได้รับสาร L-NAME ในหนูกลุ่มที่มีระดับซีโรไคโตนินต่ำส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมองจากการตรวจวัดจำนวน pinocytic vesicle และจำนวน microvilli น้อยกว่าหนูกลุ่มซีโรไคโตนินต่ำที่ไม่ได้รับสาร L-NAME ซึ่งผลการวิจัยในส่วนนี้บ่งชี้ว่าภาวะซีโรไคโตนินต่ำในหนูจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ NO ในสมอง โดยทำให้มีระดับ NO เพิ่มขึ้นกว่าปกติเมื่อถูกกระตุ้นด้วย CSD และ NO ที่สูงขึ้นนี้เองสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์เอ็นโดทีเลียมของหลอดเลือดสมองมากขึ้น ดังยืนยันได้จากผลการวิจัยที่พบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับ L-NAME มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดลดลง ซึ่งผลสรุปจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถใช้อธิบายถึงผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในปี 2000 จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าภาวะพร่องซีโรไคโตนินทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อการได้รับ NO-donor มากกว่ากลุ่มหนูที่มีซีโรไคโตนินปกติ (Srikiatkachorn และคณะ 2000) โดยสามารถอธิบายได้ว่าการตอบสนองต่อ NO-donor มากกว่าหนูปกติเนื่องจากในภาวะซีโรไคโตนินต่ำจะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง NO ออกมาเมื่อถูกกระตุ้นได้มากกว่าหนูปกติ และปริมาณของ NO ที่มากกว่าปกตินี้เองเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในหลอดเลือดสมองมากกว่าหนูกลุ่มควบคุม

นอกจากนั้นผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าหนูที่ได้รับสาร L-NAME ในภาวะที่มีซีโรไคโตนินพร่องสามารถลดจำนวนของเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน fos ในชั้นเนื้อที่ตัดออกมาจากไขสันหลังในระดับ C1-C2 ได้ จำนวนของเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน fos ในชั้นเนื้อไขสันหลังส่วนนี้เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่าสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเกิดความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง (trigeminal vascular system) ได้ (Kaube et al., 1993) ดังนั้นการลดจำนวนของเซลล์ประสาทที่แสดงออกโปรตีน fos ในกลุ่มหนูที่ได้รับสาร L-NAME ในการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าในกลุ่มที่ได้รับสาร L-NAME มีการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองน้อยกว่าในกลุ่มที่มีซีโรไคโตนินต่ำที่ไม่ได้รับสาร L-NAME แสดงให้เห็นชัดเจนถึงบทบาทของ NO ในการเพิ่มการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองในภาวะพร่องซีโรไคโตนิน

ผลจากงานวิจัยหลายงานวิจัยได้บ่งชี้ว่าสาร NO นั้นมีบทบาทในกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดทั้งในส่วนของ supraspinal และในบริเวณไขสันหลังด้วย (Cuevas และคณะ 1996; Lovick และคณะ 1993; Peterson-Zeit และ Basbaum 1999 และ Mao และคณะ 1995) โดยในระดับไขสันหลังซึ่งเป็นบริเวณที่มีการส่งผ่านสัญญาณความรู้สึกเจ็บปวดขึ้นไปยังสมองโดย second order neurons ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยหลายงานวิจัยได้บ่งชี้ว่าเซลล์ประสาทที่รับผิดชอบการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดนั้นจะเป็นเซลล์ประสาทที่กระจายตัวอยู่ในชั้นไขสันหลัง Lamina I และ II ซึ่งเป็นบริเวณที่สามารถพบเซลล์ประสาทที่แสดงโปรตีน NOS ในการศึกษาวิจัยนี้ด้วย ความเกี่ยวข้องของสาร NO ในกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดบริเวณไขสันหลังนี้ได้รับการยืนยันจากกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มเช่น Moa และคณะ และ Wu และคณะ

Moa และคณะรายงานในปี 1995 ว่า NO มีบทบาทสำคัญในการเกิดภาวะความเจ็บปวดมากกว่าปกติ (hyperalgesia) ที่เกิดจากการอักเสบ รวมทั้งมีบทบาทในการเกิดภาวะคือต่อ morphine ด้วย (Moa และคณะ 1995) นอกจากนั้นผลการศึกษาของ Wu และคณะในปี 2001 ยืนยันบทบาทของ NO ในกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดในบริเวณไขสันหลัง โดยพบว่าการฉีดสาร nitric oxide synthase inhibitor สามารถยับยั้งการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากการกระตุ้นด้วย innocuous stimuli ได้ (Moa และคณะ 1995 และ Wu และคณะ 2001)

ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สนับสนุนทฤษฎีของนักวิจัยเหล่านี้โดยพบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดปรากฏการณ์คอร์ติคัลสเปรดดิ้งดีเพรสชันนั้นสามารถตรวจพบเซลล์ประสาทที่แสดงโปรตีน NOS ในบริเวณ Laminar I และ II ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกับที่ตรวจพบเซลล์ประสาทที่ถูกกระตุ้นแสดงออก fos โปรตีน ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนจากผลการย้อม fos-NOS double stain นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ประสาทที่แสดงโปรตีน NOS ยังอยู่ในบริเวณเดียวกับที่พบปลายประสาทที่บรรจุ CGRP ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญต่อกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดด้วย (Geppetti และคณะ, 2005 และ Goadsby 2005) โดยพบว่า CGRP มีผลเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดเกิดการขยายตัว และมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ neurogenic inflammation เนื่องจาก neuropeptide CGRP นี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมอง ดังนั้นปัจจุบันนี้นักวิจัยหลายกลุ่มได้พยายามที่จะพัฒนาสาร CGRP receptor antagonist เพื่อใช้เป็นยาลดอาการปวดศีรษะไมเกรน (Geppetti et al, 2005 and Goadsby 2005)

ผลการศึกษาในคนใช้ยืนยันบทบาทของ CGRP ในพยาธิกำเนิดของโรคปวดศีรษะไมเกรน คือการพบว่าในขณะที่มีการปวดศีรษะ ระดับของสารสื่อประสาท CGRP สูงกว่าปกติ ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นต่อ afferent fiber ของ trigeminal neuron ให้มีการหลั่งสารสื่อประสาท CGRP ออกมา โดยมีผลยืนยันจากการศึกษาในคนไข้ที่ได้รับยา anti-migraine ผลจากการใช้ยา anti-migraine (sumatriptan) ในการรักษาคนไข้พบว่าสามารถลดระดับของสาร CGRP ลงได้ (Lassen et al., 2002)

จากการที่ตรวจพบเซลล์ประสาทที่แสดงโปรตีน NOS ร่วมกับเซลล์ประสาทที่ถูกกระตุ้น และ ปลายประสาทที่บรรจุ CGRP ในบริเวณ Laminar I และ II แสดงให้เห็นชัดเจนถึงบทบาทของ NO ในกระบวนการส่งผ่านความเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองโดยเป็นที่ยอมรับกันว่า NO นั้นเมื่อถูกขับออกมาจากปลายประสาทแล้วยังสามารถ penetrate กลับเข้าสู่ปลายประสาทที่หลั่ง NO แล้วกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อประสาทอื่นๆ ออกมา ซึ่งอาจรวมทั้ง CGRP ด้วย ซึ่ง การที่มีการหลั่ง CGRP ในบริเวณไขสันหลังมากขึ้นจะส่งผลให้มีการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองมากขึ้นด้วย

จากการที่ผลจากการศึกษานี้แสดงถึงการที่สาร L-NAME ซึ่งเป็นสารยับยั้งต่อการสร้าง nitric oxide สามารถลดการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์คอร์ติคัลสเปรดดิ้งดีเพรสชันต่อระบบรับรู้ความ

เจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองในหนูที่มีระดับซีโรโดนินต่ำได้ ทั้งต่อการกระตุ้นต่อระบบหลอดเลือดสมองและระบบรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองได้ แสดงว่าภาวะเพิ่มขึ้นของการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์คอร์ติคัลสเปรดดังตีเพรสชันในภาวะที่มีระดับซีโรโดนินต่ำในสัตว์ทดลอง น่าจะเกิดจากการเพิ่มปริมาณของ NO ทั้งในสมองและในไขสันหลัง ซึ่งสามารถนำไปอธิบายความสัมพันธ์ของภาวะซีโรโดนินต่ำและการเกิดอาการปวดศีรษะในคนไข้ได้ว่าน่าจะเกิดจากการที่มีระดับของ NO เพิ่มขึ้นสูงกว่าปกติในภาวะที่มีซีโรโดนินต่ำ ซึ่งจะสามารถกระตุ้นต่อระบบรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองได้

ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ช่วยให้เห็นถึงความสำคัญของสาร NO ในกระบวนการส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองได้โดยมีบทบาททั้งต่อระบบหลอดเลือดสมอง และต่อระบบส่งผ่านความรู้สึกเจ็บปวดจากหลอดเลือดสมองในไขสันหลังด้วย ดังนั้นสาร nitric oxide synthase inhibitor ต่างๆ น่าจะมีศักยภาพในการที่จะถูกพัฒนาขึ้นมาใช้เป็นยาลด และ หรือ ป้องกันภาวะปวดศีรษะจากหลอดเลือดโดยเฉพาะไมเกรนได้

เอกสารอ้างอิง

- Anthony Mm Hinterberger H, Lance JW, The possible relationship of serotonin to the migraine syndrome. *Res Clin Stud Headache* 1969; 2: 29-59
- Anuntasethakul T, Srikiatkhachorn A, Maneesri S, Patumraj S. Ultrastructural changes in endothelial cells of cerebral microvessels after exposure to nitric oxide donor. *Neuropathology*. 1999; 19: 259-266.
- Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, Villemure J-G. Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol* 1991; 30: 589-596
- Avoli M, Louvel J, Drapeau C, Pumain R, Kurcewicz I. GABA-A-mediated inhibition and in vitro epileptogenesis in the human cortex. *J Neurophysiol* 1995; 73: 468-484
- Beggs JL, Waggenger JD, Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury to the spinal cord. *Lab Invest* 1976; 34: 428-39
- Betz AL, Goldstein GW, Katzman R. Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. In Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, editors. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. 5th ed. New York: Raven Press 1994; 681-99
- Boke KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992; 587: 250-6
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3-11
- Brune B, Lapetina EG. Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem* 1989; 264: 8455-8
- Bruning TA, Chang PC, Blauw GJ, Vermeji P, van Zwieten PA. Serotonin-induced vasodilatation in the human forearm is mediated by the "nitric oxide-pathway": no evidence for involvement of the 5HT₃-receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 44-51
- Calapai G, Corica F, Corsonello A, Sautebin L, Di Rosa M, Campo GM, Buemi M, Mauro VN, Caputi AP. Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(7):975-82.
- Cuevas P, Prieto R, Saenz de Tejada I, Giménez-Gallego G. Analgesic effects of fibroblast growth factor in the rat. *Neurosci Lett*. 1996 Apr 5;207(3):175-8.
- Chopp M, Chen Q, Zhang ZG. Nitric oxide synthase is induced in cerebral endothelial cells by spreading depression. *Cephalalgia* 1993; 13 (suppl 13):S117
- Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular epithelium. *Brain Res* 1982; 241: 49-55
- Dalkara T, Moskowitz MA. Nitric oxide and the cerebral circulation. In Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesj BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press 1997; 96-8
- Davson H, Welch K, Segal MB. *The Physiology and Pathophysiology of Cerebrospinal Fluid*. New York: Churchill Livingstone 1987; 64-188

- Del Rio MS, Moskowitz MA. The trigeminal system. In Olsen J, Teflt-Hansen P, Welch KMA, ed. The Headaches. Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2000; 141-149.
- Dorhn CS, Beitz AJ. NMDA receptor mRNA expression in NOS-containing neurons in the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 1994; 175: 28-32
- Dux E, Jo F. Effect of histamine on brain capillaries. Fine structural and immuno-histochemical studies after intracarotid infusion. *Exp Brain Res* 1982; 47: 252-8
- Eisenberg HM, Suddith RL. Cerebral vessels have the capacity to transport sodium and potassium. *Science* 1979; 206: 1083-6
- Faraci FM, Brain JE. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 1994; 25: 692-703
- Faraci FM, Heistad DD. Endothelium-derived relaxing factor inhibits constrictor responses of large arteries to serotonin. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 500-6
- Feindel W, Penfield W, McNaughton F. The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. *Neurology* 1960; 10: 555-63.
- Fabricius M, Akgoren N, Lauritzen M. Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol.* 1995 Jul;269(1 Pt 2):H23-9.
- Ferrari MD, Odelink J, Tapparelli C, van Kempan GMJ, Pennings EJM, Bruyn GW. Serotonin metabolism in migraine. *Neurology* 1989; 39: 1239-42
- Ferrari MD, Saxena PR. On migraine and serotonin: a clinical and pharmacological review. *Cephalalgia* 1993; 13: 151-65
- Fishman RA. Blood-brain barrier. In Fishman RA. *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders 1992; 43-69
- Forstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, et al. Regional distribution of EDRF/NO synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 727-32
- Geppetti P, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR. CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. *J Headache Pain*. 2005 Apr;6(2):61-70. Epub 2005 Apr 8. Review.
- Goadsby PJ. Calcitonin gene-related peptide antagonists as treatments of migraine and other primary headaches. *Drugs*. 2005;65(18):2557-67. Review.
- Goldstein GW, Betz AL. Blood vessels and the blood-brain barrier. In: Asbury AK, McKhann GM, McDonald WI, editors. *Disease of the Nervous System. Clinical Neurobiology* 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders 1992; 111-22
- Goldstein GW, Betz AL. The blood-brain barrier. *Sci Am* 1986; 255: 70-9
- Goldstein GW, Betz AL. Blood vessels and the blood-brain barrier. In: Asbury AK, McKhann GM, McDonald WI, (ed.) *Disease of the Nervous System. Clinical Neurobiology* 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders 1992; 111-22.
- Govitrapong P, Limthavon C, Srikiatkachorn A. 5-HT₂ Serotonin receptor on blood platelet of migraine patients. *Headache* 1992; 32: 480-4

- Guevera-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 1994; 62: 807-10
- Hannah P, Jarman J, Glover V, Sandler M, Davies PTG, Clifford Rose F. Kinetics of platelet 5-hydroxytryptamine uptake in headache patients. *Cephalalgia* 1991; 11: 141-5
- Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 1993; 16: 206-14
- Ito A, Egashira K, Kodokami T, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nakaike R, Kuga T, Sueishi K, Shimokawa H, Takeshita A. Chronic inhibition of endothelium-derived nitric oxide synthase causes coronary microvascular structural changes and hyperactivity to serotonin in pigs. *Circulation* 1995; 92: 2636-44
- Iverson HK. N-acetylcysteine enhances nitroglycerin-induced headache and cranial arterial responses. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52: 125-33
- Iverson HK, Olesen J, Telft-Hansen P. Intravenous nitroglycerine as an experimental model of vascular headache. Basic Characteristics. *Pain* 1989; 38: 17-24
- James MF, Smith JM, Boniface SJ, Huang CL-H, Leslie RA. Cortical spreading depression and migraine: new insights from imaging? *Trends Neurosci* 2001; 24: 266-271.
- Johnson MD, Ma PM. Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*. 1993 Jun 22;332(4):391-406.
- Kaehler ST, Singewald N, Sinner C, Philippu A. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Res*. 1999 Jul 24;835(2):346-9.
- Kaube H, Keay KA, Hoskin KL, Bandler R, Goadsby PJ. Expression of c-Fos-like immunoreactivity in the caudal medulla and upper cervical spinal cord following stimulation of the superior sagittal sinus in the cat. *Brain Res*. 1993 Nov 26;629(1):95-102.
- Kimball RW, Friedman AP, Vallejo E. Effect on serotonin in migraine patients. *Neurology* 1960; 10: 107-11
- Kodokami T, Egashira K, Kuwata K, Fukumoto Y, Kozai T, Yasutake H, Kuga T, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Altered serotonin receptor subtypes mediate coronary microvascular hyperactivity in pigs with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation* 1996; 94: 182-9
- Kovacs, Bors L, Tothfalusi L, Jelencsik I, Bozsik G, Kerenui L, Komoly S. Cerebrospinal fluid (CSF) investigations in migraine. 1989; 9: 53-7
- Krom JM. Effect of astroglial degeneration on neonatal blood brain barrier marker expression. *Exp Neurol* 1996; 142: 29-35
- Kuhn DM, Arthur R Jr. Molecular mechanism of the inactivation of tryptophan hydroxylase by nitric oxide: attack on critical sulfhydryls that spare the enzyme iron center. *J Neurosci*. 1997 Oct 1;17(19):7245-51.
- Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*. 2002 Feb;22(1):54-61.
- Lauritzen M. Pathophysiology of migraine aura: the spreading depression theory. *Brain* 1994: 199-210.

- Lauritzen M. Cortical spreading depression. In: Olesen J, Teflt-Hansen P, Welch KMA (ed.). *The Headache*. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2000; 189-194.
- Lissovoy G, Lazarus SS. The economic cost of migraine. *Present state of knowledge*. *Neurology* 1994; 44 (suppl 4): S56-S62
- Liu-Chen LY, Liszakk T, King J, et al. An immunoelectron microscopic study of substance P-containing axons in feline cerebral arteries. *Brain Res* 1986; 369:12-20.
- Liu-chen L-Y, Mayberg M, Moskowitz MA. Immunohistochemical evidence for a substance P-containing trigeminovascular pathway to pail arteries in cats. *Brain Res* 1983; 268: 162-166
- Lorrain DS, Hull EM. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport* 1993; 5: 87-9
- Lossinsky AS, Vorbrodt AW, Wisniewski HM. Scanning and transmission electron microscopic studies of microvascular pathology in the osmotically impaired blood-brain barrier. *J Neurocytol.* 1995 Oct;24(10):795-806.
- Lovick TA. Serotonergic influence from nucleus raphe obscurus on neurones in the periaqueductal grey matter in the rat. *Brain Res.* 1993 Mar 19;606(1):92-8.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ. Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain.* 1995 Sep;62(3):259-74.
- Miller KJ, Hoffman BJ. Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP. *J Biol Chem* 1994; 269: 27351-6
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42
- Moskowitz MA. Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology.* 1993 Jun;43(6 Suppl 3):S16-20. Review.
- Olesen J, Iversen HK, Thompson LL. Nitric oxide supersensitivity. A possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport* 1993; 4: 1027-30
- Olesen J, Thompsen LL, Lassen LH. The Possible involvement of nitric oxide in migraine. In: F. Clifford Rose (editor) *Towards Migraine 2000*. Elsevier Science, Amsterdam 1996; 111-27
- Parson, A., Raval, P., Smith, M., Read, S., and Bingham, S. Cortical spreading depression and migraine: A Missing Link? In F. Clifford (ed.). *Towards Migraine 2000*,. Amsterdam: Elsevier, 1996; 153-159
- Penfield W, McNaughton F. Dural headache and innervation of dural mater. *Arch Neurol Psychiatry* 1940; 44: 43-75
- Petersen-Zeitz KR, Basbaum AI. Second messengers, the substantia gelatinosa and injury-induced persistent pain. *Pain.* 1999 Aug;Suppl 6:S5-12.
- Pogun S, Baumann MH, Kuhar MJ, Nitric oxide inhibits [³H]dopamine uptake. *Brain Res* 1994; 641: 93-91

- Ramos AJ, Tagliaferro P, López-Costa JJ, López EM, Pecci Saavedra J, Brusco A. Neuronal and inducible nitric oxide synthase immunoreactivity following serotonin depletion. *Brain Res.* 2002 Dec 20;958(1):112-21.
- Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Parsons AA. The dynamics of nitric oxide release measured directly and in real time following repeated waves of cortical spreading depression in the anaesthetised cat. *Neurosci Lett.* 1997 Sep 5;232(3):127-30.
- Read SJ, Smith MI, Hunter AJ and Parson AA. SB-220453 a potential novel antimigraine agent, inhibit nitric oxide release following induction of cortical spreading depression in the anesthetized cat. *Cephalalgia* 2000; 20: 92-99
- Sakai F, Mayer JS. Regional cerebral hemodynamics during migraine and cluster headache measured by the ¹³³Xe inhalation method. *Headache* 1978; 18: 122-32
- Shilling L, Wahl M. Brain edema: Pathogenesis and therapy. *Kidney Int* 1997; 51 (suppl 59): S69-75
- Scheller D, Heister U, Dengers K, Peters T. Do the excitatory amino acids aspartate and glutamate generate spreading depression in vivo? In: Kriegstein J, ed. *Pharmacology of cerebral ischemia* 1990; 205-210.
- Sicuteri F, Nicolodi M. Fibromyalgia (alies central panalgia): the severest expression of dynociception. *Proceeding of the XI Migraine Trust International Symposium London, 1997; p18*
- Sicuteri F, Testi A, Anselmi B. Biochemical incestigation in headache: increase in hydroxyindoleacetic acid excretion during migraine attack. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1961; 19: 555-8
- Srikiatkachorn A, Anuntasethakul T, Maneesri S, Phansuwan-Pujito P, Patumraj S, Kasantikul V. Hyposerotonin-induced nitric oxide supersensitivity in the cerebral microcirculation. *Headache.* 2000 Apr;40(4):267-75.
- Srikiatkachorn A, Antony M. Serotonin receptor adaptation in patients with analgesic-induced headache. *Cephalalgia* 1996; 16: 419-22
- Srikiatkachorn and Phantumchinda. Headache in an out-patient department. *Chula Med* 1992; J36:701-13
- Srikiatkachorn A, Gotrivapong P, Limthavon C. Up-regulation of 5-HT₂ serotonin receptor: a possible mechanism of transformed migraine. *Headache* 1994; 34: 8-11
- Srikiatkachorn and Phantumchinda. Headache in an out-patient department. *Chula Med* 1992; J36:701-13
- Szerb JC. Glitamate release and spreading depression in the fascia dentate in response to microdialysis with high K⁺: role of glia. *Brain Res* 1991; 542: 259-265.
- Tagliaferro P, Ramos AJ, Lopez-Costa JJ, López EM, Brusco A. Changes in the postnatal development on nitric oxide system induced by serotonin depletion. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 Dec 19;146(1-2):39-49.
- Thompson LL, Iversen HK, Brink TAL, Olesen J. Arterial hypersensitivity to nitric oxide (nitroglycerin) in migraine sufferers. *Cephalalgia* 1993; 13: 395-9

- Uddman R, Edvinsson L, Ekman R, et al. Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci Lett* 1985; 62: 131-6.
- Wolberg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrel CL, Risau WW. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocyte. *J Cell Sci* 1994; 107: 1347-534
- Wotherspoon G, Albert M, Rattray M, Priestley JV. Serotonin and NADPH-diaphorase in the dorsal raphe nucleus of the adult rat. *Neurosci Lett* 1994; 173: 31-6
- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain*. 2001 Oct;94(1):47-58.

ภาคผนวก

Research Output

การเผยแพร่ผลงาน

1. คณะผู้วิจัยได้รวบรวมผลงานเพื่อตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง Involvement of NO in the facilitation of the trigeminal nociception induced by serotonin depletion

ในวารสาร Headache ดัง manuscript ที่แนบมาด้วยนี้

2. ผลงานส่วนหนึ่งได้ร่วมตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง Serotonin depletion, cortical spreading depression, and trigeminal nociception. โดยมีรายชื่อผู้ร่วมวิจัย คือ Supornsilpchai W, Sanguanrangsirikul S, Maneesri S, Srikiatkachorn A. ตีพิมพ์ในวารสาร Headache. 2006 Jan;46(1):34-9 และมีค่า impact factor เท่ากับ 2.740

การนำเสนอผลงาน

1. นำเสนอผลงาน เรื่อง Inhibitory effect of L-NAME on CSD-induced trigeminal nociception : Vascular VS neuronal mechanism ในการประชุม 12 th Congress of the International Headache Society ระหว่างวันที่ 26-29 เมษายน 2549 ณ เมืองวาเลนเซีย ประเทศ สเปน โดยได้นำเสนอผลงานเป็น oral presentation ในวันที่ 27 เมษายน 2549
2. นำเสนอผลงาน เรื่อง “Serotonin depletion enhances the trigeminal nociception: vascular VS neuronal mechanism ” ในการประชุม นักวิจัยใหม่พบ เมธีวิจัยระหว่างวันที่ 12 ตุลาคม -14 ตุลาคม 2549 รวม 2 วัน ณ โรงแรมริเจนท์ชะอำ จอมเทียน จังหวัดเพชรบุรี
3. นำเสนอผลงาน เรื่อง “Involvement of NO in the trigeminal nociceptive facilitation induced by serotonin depletion” ในการประชุม 13 th Congress of the International Headache Society ประเทศ สวีเดน ระหว่างวันที่ 28 มิถุนายน-1 กรกฎาคม 2550 รวม 4 วัน
4. นำเสนอผลงาน เรื่อง “Involvement of NO in the trigeminal nociceptive facilitation induced by serotonin depletion” ในการประชุม นักวิจัยใหม่พบ เมธีวิจัยระหว่างวันที่ 11 ตุลาคม -13 ตุลาคม 2550 รวม 3 วัน ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ซีดี จอมเทียน จังหวัดชลบุรี