

ผลของนอซีเซปตินต่อกระบวนการเกิดความปวดไทรเจมินาลที่ถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์

คอรีติคอลสเปรตติ้งดีเพรสชันในหนูแรท



นาย ธรรมศ พิศลย์กุลเกษม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 8 9 1 0 0 8 2 0

THE EFFECTS OF NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ ON TRIGEMINAL NOCICEPTION
INDUCED BY CORTICAL SPREADING DEPRESSION IN RATS

Mr. Thas Phisonkunkasem

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Physiology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

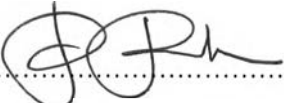
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University


522201

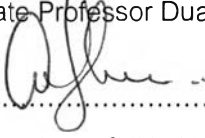
Thesis Title THE EFFECTS OF NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ ON
TRIGEMINAL NOCICEPTION INDUCED BY CORTICAL
SPREADING DEPRESSION IN RATS
By Mr. Thas Phisonkunkasem
Field of Study Physiology
Thesis Advisor Professor Anan Srikiatkachorn, M.D.
Thesis Co-advisor Saknan Bongsebandhu-phubhakdi, Ph.D.


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

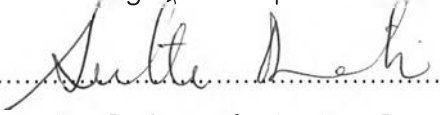

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

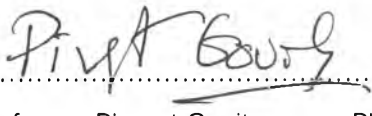
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Duangporn Thong-Ngam, M.D.)


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


..... Thesis Co-advisor
(Saknan Bongsebandhu-phubhakdi, Ph.D.)


..... Examiner
(Associate Professor Sutthasinee Poonyachoti, D.V.M., Ph.D.)


..... External Examiner
(Professor Piyarat Govitrapong, Ph.D.)

ธรรมชาติ พิศลักษณ์กุลเกษม : ผลของนอซิเซปตินต่อกระบวนการเกิดความปวดไตรเจมินาลที่
ถูกกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์คอร์ติคอลสเปรดดิ้งดีเพรสชันในหนูแรท (THE EFFECTS
OF NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ ON TRIGEMINAL NOCICEPTION INDUCED
BY CORTICAL SPREADING DEPRERSSION IN RATS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ศ. นพ. อนันต์ ศรีเกียรติขจร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. ศักนัน
พงศ์พันธุ์ผู้กำกับ: 80 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของนอซิเซปตินต่อการเปลี่ยนแปลงของปรากฏการณ์
คอร์ติคอล สเปรดดิ้ง ดีเพรสชัน (Cortical Spreading Depression; CSD) และระบบรับความเจ็บปวดไตรเจ
มินาล โดยแบ่งหนูพันธุ์สตัคเคอส์ ออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มควบคุม กลุ่มที่กระตุ้นให้เกิด
ปรากฏการณ์คอร์ติคอล สเปรดดิ้ง ดีเพรสชัน และกลุ่มที่กระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์คอร์ติคอล สเปรดดิ้ง ดี
เพรสชันร่วมกับการให้นอซิเซปติน โดยวิธีการฉีดเข้าสู่ช่องน้ำเลี้ยงสมอง-ไขสันหลัง การกระตุ้นปรากฏการณ์
คอร์ติคอล สเปรดดิ้ง ดีเพรสชัน ทำโดยการวางผลึกโพแทสเซียมคลอไรด์ขนาด 3 มิลลิกรัม ลงบนผิวสมอง
ใหญ่ การบันทึกการทำงานของสมองใหญ่ทำโดย การสอดขั้วบันทึกขนาดเล็กชนิดแก้วลงในบริเวณสมองส่วน
หน้า ช่างเดียวกับที่วางโพแทสเซียมคลอไรด์ ส่วนผลกระทบต่อระบบความเจ็บปวดไตรเจมินาล จะศึกษาการ
แสดงออกของ Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 (TRPV1) ในปมประสาทไตรเจมินาล
และโปรตีน Fos ในกลุ่มเซลล์ประสาทไตรเจมินาลคอตาเลีย ผลการศึกษาพบว่า การวางโพแทสเซียมคลอไรด์
ลงบนผิวสมองใหญ่ สามารถกระตุ้นทำให้เกิด depolarization shift ซึ่งเป็นลักษณะของปรากฏการณ์คอร์ติ
คอล สเปรดดิ้ง ดีเพรสชันได้ โดยพบการเปลี่ยนแปลงของคลื่นคอร์ติคอล สเปรดดิ้ง ดีเพรสชัน มากขึ้นในกลุ่ม
ที่ได้รับนอซิเซปติน กล่าวคือมีการเพิ่มขึ้นของความถี่คลื่น, ความสูงของคลื่น, และพื้นที่ใต้กราฟ การศึกษา
อิมมูโนฮิสโตเคมีสเทียของ โปรตีน TRPV1 และ Fos ให้ผลในลักษณะเดียวกันกล่าวคือมีจำนวนเซลล์
ประสาทที่ย้อมติด TRPV1 ในปมประสาทไตรเจมินาลและ Fos ในกลุ่มเซลล์ประสาทไตรเจมินาลคอตาเลีย
เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับนอซิเซปติน

ผลจากการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการได้รับนอซิเซปตินต่อการเปลี่ยนแปลงการ
ทำงานของสมองใหญ่และระบบรับความเจ็บปวดไตรเจมินาล ซึ่งนอซิเซปตินสามารถเพิ่มความไวในการ
ทำงานของทำงานของสมองใหญ่และเพิ่มการทำงานของเซลล์ประสาทในระบบรับความเจ็บปวดไตรเจมินาล

สาขาวิชา..... สรีรวิทยา.....
ปีการศึกษา..... 2552.....

ลายมือชื่อ นิสิต *ปิศลักษณ์กุลเกษม*
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม *อนันต์ ศรีเกียรติขจร*

4989100820: MAJOR PHYSIOLOGY

KEYWORDS : CORTICAL SPREADING DEPRESSION / NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ / TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID SUBTYPE 1 / DEPOLARIZATION SHIFT / TRIGEMINAL NOCICEPTION

THAS PHISONKUNKASEM: THE EFFECTS OF NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ ON TRIGEMINAL NOCICEPTION INDUCED BY CORTICAL SPREADING DEPRESSION IN RATS. THESIS ADVISOR: PROF. ANAN SRIKIATKHACHORN, M.D. THESIS CO-ADVISOR SAKNAN BONGSEBANDHU-PHUBHAKDI, Ph.D.
80 pp.

The present study aimed to determine the effect of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) on development of cortical spreading depression (CSD) and trigeminal nociception. Adult male Wistar rats were divided into three groups, including control group, CSD without N/OFQ group, and CSD with receiving N/OFQ group. N/OFQ (10uM; 100ul) and vehicle (0.9% of normal saline solution; 100ul) were applied by intrathecally injection (i.t.) into the cerebrospinal fluid. CSD was induced by application of 3 mg of potassium chloride crystal on the parietal cortex. Cortical activity was monitored by inserting glass microelectrode into the frontal cortex, ipsilateral side to the potassium chloride application. Effects of N/OFQ on trigeminal nociceptive system were studied by using the expression of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) in the trigeminal ganglia (TG), as well as the expression of a transcription factor Fos in trigeminal nucleus caudalis (TNC). The results showed that application of potassium chloride resulted in series of depolarization activity characteristic for CSD. The development of these CSD waves was enhanced in CSD with N/OFQ receiving group. Such enhancement was characteristic by increased frequency of CSD wave, amplitude of CSD, and area under the curve of each CSD wave. Results from the TRPV1- and Fos-immunohistochemical studies revealed the similar pattern. Greater numbers of TRPV1 in TG and Fos in TNC were observed in N/OFQ group. These results demonstrated that N/OFQ increases cortical excitability and neuronal activity in trigeminal nociceptive system.

Field of Study : Physiology

Academic Year : 2009

Student's Signature *Thas Phisonkunkasem*

Thesis Advisor's Signature *[Signature]*

Thesis Co-advisor's Signature *Saknan Bongsebandhu-phubhakti*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Professor Dr. Anan Srikiatkachorn for his valuable guidance, and supervision which have enable me to carry out my study successfully. I would like to express my deepest appreciation to my co-advisor, Dr.Saknan Bongsebandhu-phubhakdi, who empathized himself to train, suggest, polish me throughout my experiment. I am also deeply beholden to my teachers for their financial support.

I am very grateful to the members of the thesis committee for their magnificent comments and the correction of this thesis. I am very grateful to Associate Professor Dr. Sompol Saganrungrasirikul and Dr. Weera Supornsilpchai for training me about the setting of electrophysiology technique and helping me to more understands my research.

I would like give a very special vote to thank to Mr. Montree Maneepak for to training me about immunohistochemical technique throughout this study

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

My appreciations are also devoted to my dear father, mother for their love, kindness and support my mind throughout my life. I would like to thanks Ms. Wisaluk for her valuable help, motivate and cheerfulness throughout this study.

CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
 CHAPTERS	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEWS.....	4
Migraine.....	4
Migraine: definition and classification.....	4
Trigeminal System and Pathogenesis of Migraine.....	6
Cortical spreading depression (CSD).....	12
Methods to induce CSD.....	18
The transient receptor potential vanilloid subtype 1.....	19
Nociceptin/Orphanin FQ.....	26
Fos.....	29
III MATERIALS AND METHODS.....	31
Animals.....	31
Chemicals.....	31
Experimental design.....	32
Animal preparation.....	34
Electrocorticographic recording.....	35
Immunohistochemical study.....	39
Statistic analysis.....	40

CONTENTS (Continue)

	PAGE
IV RESULTS.....	41
The electrophysiological variables related to CSD-evoke DC shift.....	42
Effect of N/OFQ on development of CSD-evoked depolarization shift.....	51
Effect of N/OFQ on TRPV1 expression in TG.....	53
Effect of N/OFQ on the c-Fos expression in TNC.....	56
V DISCUSSION.....	60
VI CONCLUSION.....	66
REFERENCES.....	67
BIOGRAPHY.....	80

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
4.1 The mean value \pm SD of amplitude of DC shift obtained from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group.....	44
4.2 The mean value \pm SD of average numbers of DC shift obtained from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group.....	45
4.3 The mean value \pm SD of average AUC of DC shift obtained from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group.....	46
4.4 The mean value \pm SD of sum of AUC of DC shift obtained from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group.....	47
4.5 The mean value \pm SD of interpeak latency of DC shift obtained from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group.....	48
4.6 The mean value \pm SD of duration of DC shift obtained from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group.....	49
4.7 Comparing the electrophysiology variables related to CSD between the KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group.....	50
4.8 The mean \pm SD of amplitude sequence obtained from KCl-vehicle and KCl- N/OFQ group.....	52
4.9 The mean value \pm SD of numbers of TRPV1-IR cells in the TG section obtained from NaCl-vehicle, KCl-vehicle, and KCl-N/OFQ groups.....	54
4.10 The mean value \pm SD of number of Fos-IR cells in the TNC section obtained from NaCl-vehicle, KCl-vehicle, and KCl-N/OFQ groups.....	58

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Structure of trigeminal nerve.....	6
2.2 Trigeminal pathway.....	7
2.3 The relationship between trigeminal nerve and the cranial vasculature.....	9
2.4 Nociceptive afferent fibers in the dorsal horn of the spinal cord.....	10
2.5 Demonstration of the spread of cortical spreading depression in the rabbit neocortex.....	13
2.6 Successive maps of a scintillating-scotoma.....	14
2.7 Hypothesis of the CSD development in migraine attack.....	16
2.8 Proposed model of the topology of TRPV1 subunits.....	20
2.9 Sequence of the OFQ/N1–17 peptide with other opioid peptides. Shaded areas represent homologous residues between OFQ/N1–17 and other peptides.....	26
3.1 Diagram of experimental design.....	33
3.2 The repeated pattern of cortical depolarization characterizing the CSD.....	34
3.3 The pattern of cortical activity in NaCl application group.....	35
3.4 Diagram of electrophysiological recording in animal model.....	36
3.5 Schematic of the amplitude measurement.....	37
3.6 Schematic illustration shows the number of a depolarization shift.....	37
3.7 Schematic of the area under the curve (AUC) measurement.....	37
3.8 Schematic of the interpeak latency measurement.....	38
3.9 Schematic of the duration measurement.....	38
4.1 The tracing shows the KCl application induced repeated pattern of cortical depolarization characterizing the CSD.....	43
4.2 The tracing showing the KCl application and effect of N/OFQ on cortical activity.....	43
4.3 The tracing showing the NaCl application had no effect on cortical activity.....	43

LIST OF FIGURES (Continue)

FIGURE	PAGE
4.4	Bar graphs shows the mean value \pm SD of amplitude of peaks from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 44
4.5	Bar graphs shows the mean value \pm SD of number of peaks from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 45
4.6	Bar graphs shows the mean value \pm SD of average AUC from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 46
4.7	Bar graphs shows the mean value \pm SD of sum of AUC from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 47
4.8	Bar graphs shows the mean value \pm SD of interpeak latency from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 48
4.9	Bar graphs showing the mean value \pm SD of duration from KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 49
4.10	Bidirect effects of N/OFQ on development of CSD-evoke depolarization shift..... 51
4.11	Bar graphs showing the mean value \pm SD of number of TRPV1-IR from NaCl-vehicle, KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 54
4.12	The photomicroscope showing the TRPV1-IR cells in the TG section obtained from A. NaCl-vehicle group B. KCl-vehicle group and C. KCl-N/OFQgroup..... 55
4.13	Distribution of Fos-IR cells in dorsal horn of TNC..... 57
4.14	The bar graphs show the mean value \pm SD of number of Fos-IR from NaCl-vehicle, KCl-vehicle and KCl-N/OFQ group..... 58
4.15	The photomicrograph showing the Fos-IR cells in the TNC section from A. NaCl-vehicle group B. KCl-vehicle group and C. KCl-N/OFQ group..... 59

LIST OF ABBREVIATIONS

μM	Micromolar
AUC	Area under the curve
C1	Cervical segment 1 of spinal cord
C2	Cervical segment 2 of spinal cord
Ca^{2+}	Calcium ion
CSD	Cortical spreading depression
CGRP	Calcitonin gene related peptide
DC shift	Depolarization shift
DAB	Diaminobenzidine
DRG	Dorsal root ganglia
EEG	Electroencephalography
g	Gram
GPCR	G protein-coupled receptor
H	Hour
H^+	Hydrogen ion
ir	Immunoreactivity
it	Intrathecal
K^+	Potassium ion
KCl	Potassium chloride
M	Molar
mg	Milligram
mm	Millimeter
Min	Minute
mL	Milliliter
mV	Millivolt

Na ⁺	Sodium ion
NaCl	Sodium chloride
NKA	Neurokinin A
NO	Nitric oxide
N/OFQ	Nociceptin/Orphanin FQ
ORL-1	Opioid Receptor Like-1
PBS	Phosphate buffer saline
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
SP	Substance P
TG	Trigeminal ganglion
TNC	Trigeminal nucleus caudalis
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1