

บทบาทของตัวรับซีโรโตนิน ชนิด 1 และ 2

ในการปรับความเจ็บปวดในหนูแรท

นางสาวอัญชลี เรืองพัฒนทวี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดำเนินการตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสตรีวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-241-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ROLES OF SEROTONIN RECEPTOR TYPES 1 AND 2
IN PAIN MODULATION IN RAT**

Miss Unchalee Ruangpattanatawee



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

Inter-department of Physiology

Graduate School

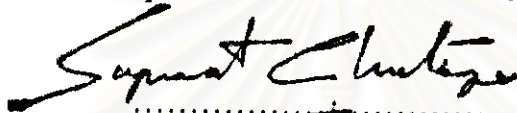
Chulalongkorn University

Academic year 1998

ISBN 974-332-241-8


Thesis Title ROLES OF SEROTONIN RECEPTOR TYPES
 1AND 2 IN PAIN MODULATION IN RAT.
By Miss unchalee Ruangpattanatawee
Inter-department Physiology
Thesis Advisor Associate Professor Anan Srikiatkachorn, M.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Pansiri Phansuwan-Pujito, Ph.D.

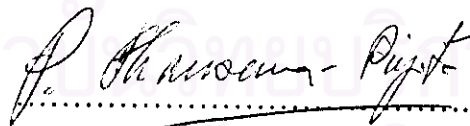
Accepted by the Graduate school, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

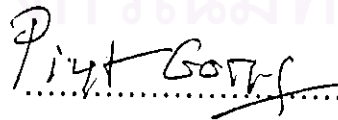

.....Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Professor Dr. Ratre Suduang, Ph.D.)


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


.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Dr. Pansiri Phansuwan-Pujito, Ph.D.)


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

ัญชติ เรื่องพัฒนาทวิ: บทบาทของตัวรับซีโรโตนิน ชนิด 1 และ 2 ในการปรับความเจ็บปวดในหนูแรท

(Roles of serotonin receptor types 1 and 2 in pain modulation in rat)

อ. ที่ปรึกษา: รศ. นพ. อนันต์ ศรีเกียรติจงจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร.ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ;

125 หน้า ISBN 974-332-241-8

สารสื่อประสาทซีโรโตนินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการปรับความเจ็บปวดของระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งอาจจะออกฤทธิ์โดยผ่านตัวรับซีโรโตนินชนิดต่างๆ การทดลองนี้ได้ศึกษาถึงบทบาทของตัวรับซีโรโตนินชนิด 1 และ 2 ในกระบวนการปรับความเจ็บปวด ทำการศึกษาโดยแบ่งหนูพันธุ์วิสต้าออกเป็น 3 กลุ่มๆละ 8 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มที่ได้รับ 5-HT₁ agonist (8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tetralin: 8-OH-DPAT 3 mg/kg เข้าทางช่องท้อง), กลุ่มที่ได้รับ 5-HT₂ agonist (1,2,5-dimethoxy-4-iodophenyl-2-amino-propane: DOI 1 mg/kg เข้าทางช่องท้อง), และกลุ่มควบคุมได้รับน้ำเกลือ กระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อนที่หางด้วยเครื่อง tail flick และเจ็บปวดด้วยสารเคมีโดยการฉีด เข้าชั้นใต้ผิวหนังบริเวณช่วงท้าย ศึกษาพฤติกรรมที่ตอบสนองต่อความเจ็บปวดจากการฉีดฟอร์มาลินได้แก่ พฤติกรรม lifting, licking และ scratching ในช่วงหลังฉีด 0-10 นาที (phase I) และ 10-60 นาที (phase II) จากนั้นนำไขสันหลังระดับ C₇-T₁ มาศึกษา Fos-like immunoreactivity (FLI) โดยวิธี immunohistochemistry ซึ่งปริมาณ Fos ที่เกิดขึ้นจะเป็นสิ่งที่บ่งชี้การทำงานของเซลล์ได้ ผลการทดลองพบว่าในหนูกลุ่มที่ทำให้เกิดความเจ็บปวดด้วยเครื่อง Tail flick นั้น กลุ่มที่ได้รับ 8-OH-DPAT จะสามารถเพิ่มช่วงเวลาที่ทนต่อความร้อน (tail flick latency) ได้ (จาก 5.91±0.42 วินาที ในกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดยา เป็น 12.11±0.49 วินาที ในกลุ่มที่ได้รับการฉีดยา, P<0.001) ในขณะที่ DOI จะลดช่วงเวลา tail flick latency (จาก 7.35±0.81 ในกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดยา และ 1.29±0.13 วินาที ในกลุ่มที่ได้รับการฉีดยา, P<0.001) ผลการทดลองในกลุ่มที่สังเกตพฤติกรรมที่ตอบสนองต่อความเจ็บปวดพบว่า 8-OH-DPAT ลดพฤติกรรม lifting ได้ในช่วง phase I (7.10±1.85 และ 1.17±0.30 วินาที สำหรับกลุ่มที่ได้รับ 8-OH-DPAT และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ P<0.05) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มที่ได้รับ DOI อย่างไรก็ตามพบว่าผลของ DOI ทำให้เกิดการกดระบบการเคลื่อนไหว (motor depression) ในช่วงเวลา 30-60 นาที ฤทธิ์ดังกล่าวจะสามารถบดบังพฤติกรรมที่ตอบสนองต่อความเจ็บปวดที่สัตว์ทดลองแสดงออกได้ นอกจากนี้ผลของ 5-HT agonists ต่อการปรับความเจ็บปวดยังพบว่าหากกลุ่ม 5-HT agonists สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะของ FLI ใน dorsal horn ของไขสันหลัง โดยพบว่าจำนวน FLI ในกลุ่ม 8-OH-DPAT มีจำนวนต่ำลง ในขณะที่กลุ่ม DOI จะเพิ่มจำนวนเซลล์เหล่านี้ จำนวนของ FLI ใน lamina V ของกลุ่มที่ได้รับ 8-OH-DPAT, DOI, และกลุ่มควบคุม เท่ากับ 17.15±1.65, 12.87±1.16, และ 20.31±1.12 เซลล์/สไลด์ การเปลี่ยนแปลงของ FLI มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ได้รับ 8-OH-DPAT และ DOI แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาในครั้งนี้บ่งชี้ว่าการกระตุ้นตัวรับซีโรโตนินชนิด 1 จะช่วยลดความเจ็บปวด ในขณะที่ตัวรับซีโรโตนินชนิด 2 จะเพิ่มความเจ็บปวด

ภาควิชา สรีรวิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิติ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C 845819

MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD:

SEROTONIN RECEPTOR / PAIN MODULATION

UNCHALEE RUANGPATTANATAWEE : ROLES OF SEROTONIN

RECEPTOR TYPES 1 AND 2 IN PAIN MODULATION IN RAT

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANAN SRIKIATKHACHORN, M.D.

THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PANSIRI PHANSUWAN-PUJ, Ph.D.

125 pp. ISBN 974-332-241-8

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter that plays a major role in central nociceptive modulation. This transmitter exerts its nociceptive modulation effects via a wide variety of its receptor subtypes. This study was conducted to clarify the roles of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in pain modulating mechanism. Adult male Wistar rats were divided into 3 groups (8 rats each), 5-HT_{1A} agonist (receiving 8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tetralin: 8-OH-DPAT 3 mg/kg intraperitoneal; i.p), 5-HT_{2A} agonist (receiving 1,2,5-dimethoxy-4-iodophenyl-2-aminopropane: DOI 1 mg/kg i.p.) and control groups. Nociception was quantified by tail flick and formalin tests. The nociceptive behaviors (lifting, licking and scratching) in response to subcutaneous formalin injection were measured within 10 min (phase I) and 10-60 min (phase II) after injection. The spinal cords were then removed for further detection of Fos-immunoreactive neurons by method of immunohistochemistry. Number of dorsal horn neuron with Fos-like immunoreactivity (FLI) was used as an indicator of neuronal activity. The results showed that, pretreatment with 8-OH-DPAT significantly increased tail flick latency (5.91±0.42 and 12.11±0.49 seconds, for with and without drug administrations respectively, P<0.001). On the contrary, pretreatment with DOI significantly decreased tail flick latency (7.35±0.81 and 1.29±0.13 seconds, for with and without drug administrations respectively, P<0.001). A significant decrease in formalin-induced lifting behavior was observed in 8-OH-DPAT group as compared to the control group (7.10±1.85, 1.17±0.30 seconds, in phase I of control and 8-OH-DPAT group, respectively at p<0.05). No significant change in nociceptive behaviors was demonstrated in the DOI group. However, it was observed that DOI produced motor depression in the late phase (30-60 min) of behavioral observation. This motor depression effect may interfere with the quantification of the nociceptive behaviors. Besides effect on nociceptive behavioral modification, administration of 5-HT receptor agonists also modified pattern of noxious stimulation-induced FLI in spinal dorsal horn. A decrease in number of FLI was observed in 8-OH-DPAT group, whereas the reverse was observed in DOI group. The average numbers of FLI in lamina V in control, 8-OH-DPAT and DOI groups were 17.15±1.65, 12.87±1.16 and 20.31±1.12 cells/slide, respectively. Comparison of number of FLI between 8-OH-DPAT and DOI groups revealed statistical significant (P<0.05). However, the 5-HT agonist-induced change in dorsal horn FLI did not reach the statistical significance when compared to the controls. Based on the present behavioral and FLI studies, one may suggest that stimulation of 5-HT_{1A} receptor attenuates both heat and chemical spinal pain processing mechanism while 5-HT_{2A} potentiates.

ภาควิชา สรีรวิทยา

สาขาวิชา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิสิต Unchalee Ruangpattanatawee

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Anan Srikiatkhachorn, for his kindness, guidance, thoughtful advice and encouragement throughout this successful study.

I also wish to express my special thanks to my co-advisor, Associate Professor Dr. Pansiri Phansuwan-Pujito, for her thoughtfulness, valuable advice and comments throughout this my thesis.

I am indebted to all staff members of the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their valuable help.

It is my pleasure to thank Assistant Professor Dr. Kosum Chansiri, Head of Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, for her kindness in providing the laboratory in immunohistochemical study.

I also wish to express my special thanks to Mrs. Supatra Amatyakul, Dr. Pornpimon Tangchaisin, Mr. Athakorn Kuttrakul, Miss Supang Maneesri, Mrs. Thiraporn Anuntasethakul, Miss Sarunya Thanamittramane for their assistance, sincerity, friendship and encouragement.

My special thanks are also extended to Assistant Professor Dr. Banthit Chetsawang, staff of Neuro-Behavioural Biology Center, Mahidol University at Salaya, and Miss Siriwan Thammikul for their helpful in technical guidance in my thesis.

I would like to extend my graduate thanks to the Graduate School, Chulalongkorn University and Radchadapisek Sompoch Research Fund. for the financial support in conducting this study.

Finally, I would like to express my infinite thanks and gratitude to my parent for her love, kindness, encouragement and understanding.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURE	ix
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIALS AND METHODS	49
III. RESULTS	54
IV. DISCUSSION AND CONCLUSION	80
REFERENCES	94
BIOGRAPHY	125



 สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. Operational characteristics of 5-HT receptors	15
2. Criteria for receptor characterization	20
3. Behavioral changes in nociceptive responsiveness depending on the.. 5-HT receptor subtypes activated	37
4. Comparison of pre-and post-test in tail flick latency among..... NSS, 8-OH-DPAT and DOI group	55
5. Comparison of time course of lifting behavior response	57
6. Comparison of time course of licking behavior response	59
7. Comparison of time course of scratching behavior response	61
8. Comparison of pattern and number of Fos-immunoreactive neurons ... in formalin-injected and NSS-injected left forepaw	64
9. The number of Fos-immunoreactive neurons at C ₇ spinal level	67
in control and treated groups	
10. The number of Fos-immunoreactive neurons at C ₈ spinal level	70
in control and treated groups	
11. The number of Fos-immunoreactive neurons at T ₁ spinal level	73
in control and treated groups	
12. The number of Fos-immunoreactive neurons at C ₇ -T ₁ spinal level	76
in the NSS, 8-OH-DPAT and DOI group	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. Schematic diagram of the lateral spinothalamic tract	4
2. Summary of major components of the upper lamina of the spinal cord dorsal horn	7
3. The biosynthesis and catabolism of serotonin	9
4. Key steps in serotonergic transmission	11
5. Schematic drawing depicting the location of the serotonergi cell body groups in a sagittal section of the rat central nervous system and their major projections	13
6. Dendrogram analysis of 5-HT receptors of	18
the G-protein-couple family.	
7. Effect of 8-OH-DPAT, DOI and NSS on tail flick latency	56
8. Bar graphs represented the time course of lifting behavior response ...	58
among NSS, 8-OH-DPAT, and DOI group	
9. Bar graphs represented the time course of licking behavior response...	60
among NSS, 8-OH-DPAT, and DOI group	
10. Bar graphs represented the time course of scratching behavior	62
among NSS, 8-OH-DPAT, and DOI group	
11. The photomicrograph illustrated the formalin-evoked Fos	66
immunoreactive neurons from the section of C ₈ spinal level two hours after formalin injection.	
12. Bar graph represented the number of Fos-immunoreactive neuron ...	68
at C ₇ spinal level	
13. Diagram showing the distribution of Fos-immunoreactive	69
neurons at C ₇ spinal level 2 hours after formalin injection.	
14. Bar graph represented the number of Fos-immunoreactive neurons	71
at C ₈ spinal level	
15. Diagram showing the distribution of Fos-immunoreactive neurons	72

- at C₈ spinal level 2 hours after formalin injection.
16. Bar graph represented the number of Fos-immunoreactive neuron ...73
at T₁ spinal level
17. Diagram showing the distribution of Fos-immunoreactive neurons ...74
at T₁ spinal level 2 hours after formalin injection.
18. Bar graph represented the number of Fos-immunoreactive neurons.....77
averaged form C₇-T₁ spinal level
19. The photomicrograph illustrated the effects of the 5-HT agonists79
on formalin-evoked Fos immunoreactive neurons
20. Proposed mechanism of 5-HT_{1A} related nociceptive attenuation91
21. Proposed mechanism of 5-HT_{2A} related nociceptive facilitation92



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ADP	adenosine diphosphate
alpha-Me-5HT	alpha-methyl-5-hydroxytryptamine
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
bw	body weight
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Cl ⁻	chloride ion
CNS	central nervous system
DAB	diaminobenzidine
DOI	1,(2,5-dimethyl-4-iodophenyl)-2-Aminopropane
DLPT	dorsolateral pontine tegmentum
EDRF	endothelial-derive relaxing factor
FLI	Fos-like immunoreactive cell
g	gram
G-protein	guanine nucleotide protein
[¹²⁵ I] GTI	serotonin-5-O-carboxymethyl-glycyl [¹²⁵ I] tyrosinamide
8-OH-DPAT	8-hydroxy-(2-di-n-propylamino)-tetralin
5-MeODMT	5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine
h	hour
[³ H]	tritium
HCl	hydrochloric acid
5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HT ₁ agonist	5-hydroxytryptamine1 agonist
5-HT ₂ agonist	5-hydroxytryptamine2 agonist
i.p.	intraperitoneal
i.th.	intrathecal

K ⁺	potassium ion
kg	kilogram
LSD	lysergic acid diethylamide
μl	microliter
μM	micromole
mg	milligram
MAO-A	monoamine oxidase A
mCPP	m-chlorophenylalanine
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	normal concentration
NaCl	sodium chloride
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NRM	nucleus raphe magnus
NSS	normal saline solution
PAG	periaqueductal gray
PBS	phosphate buffer saline
RNA	ribonucleic acid
RVM	rostral ventromedial medulla
RU 24969	5-methoxy-3(1,2,3,6-tetrahydropyridin-4yl)-1H-indole
s.c.	subcutaneous
sec	second
SP	substance P
TMRs	transmembrane region
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride