

การตรวจหาระบบประสาทนิวโรเปปไทด์ที่มาควบคุมการสร้าง
ฮอร์โมนเมลาโทนิน
ในต่อมไพเนียลของคน

The characterization of the neuropeptidergic innervation in
controlling melatonin synthesis in the human pineal gland

10 ต.ค. 2543

ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินปี 2542)

142683

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
วัตถุประสงค์	6
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา	7
ผลการศึกษา	9
อภิปรายผล	30
กิตติกรรมประกาศ	34
เอกสารอ้างอิง	35

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาระบบประสาทนิวโรเปปไทด์ชนิด neuropeptide Y (NPY), vasointestinal peptide (VIP), opioid peptide, substance P และ somatostatin ที่คาดว่าน่าจะมาควบคุมการทำงานของต่อมไพลีเนียลของคน โดยใช้วิธี immunohistochemistry การศึกษาทำโดยใช้ antisera ต่อ NPY, VIP, leu-enkephalin, substance P และ somatostatin ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อของต่อมไพลีเนียลของคนที่ตัดเป็นชิ้นบางขนาด 20 ไมครอน และใช้วิธี immunoperoxidase และสาร avidin-biotin complex ช่วยในการแสดงผล ผลการทดลองพบว่า มีระบบประสาท NPYergic, opioidergic, substance Pergic และ somatostatinergic มาควบคุมต่อมไพลีเนียลของคน แต่ไม่พบระบบประสาท VIPergic โดยระบบประสาท NPYergic นั้น พบเฉพาะเส้นประสาทในปริมาณที่มากเมื่อเทียบกับชนิดอื่นที่ศึกษาในครั้งนี้ แต่ไม่พบเซลล์ประสาท ต้นกำเนิดของเส้นประสาทเหล่านี้คาดว่ามาจากทั้งสมองและปมประสาท สำหรับระบบประสาทชนิด opioidergic นั้นพบเซลล์มาก ส่วนเส้นประสาทจะน้อยมาก ดังนั้นจึงคาดว่า ระบบประสาทนี้ควบคุมต่อมไพลีเนียลโดยเซลล์ประสาทภายในตัวต่อมเองซึ่งเซลล์ประสาทเหล่านี้อาจเป็น postganglionic parasympathetic neuron ก็ได้ ระบบประสาทชนิด substance Pergic นั้น พบทั้งเส้นประสาทในปริมาณปานกลางและเซลล์ประสาทบ้าง คาดว่าต้นกำเนิดของเส้นประสาทเหล่านี้มาจากสมองและมาจากเซลล์ประสาทในต่อมเอง ส่วนระบบประสาทชนิด somatostatin นั้นพบทั้งเส้นประสาทและเซลล์ประสาทในปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถบ่งบอกถึงต้นกำเนิดของการควบคุมได้

สรุปว่าการวิจัยครั้งนี้แสดงว่าต่อมไพลีเนียลของคนมีระบบประสาทนิวโรเปปไทด์ชนิด NPYergic, opioidergic, substance Pergic และ somatostatinergic มาควบคุมการทำงาน ซึ่งในแต่ละระบบจะมีความแตกต่างกันในลักษณะที่มาควบคุม

บทนำ

ต่อมไพเนียลเป็นต่อมไร้ท่อที่อยู่ที่สมองส่วน epithalamus โดยจะยื่นออกมาระหว่างส่วน habenular commissure และ posterior commissure ต่อมนี้มีความสำคัญมากโดยทำหน้าที่เป็น neuroendocrine transducer organ (Ebadi, 1984) คือเปลี่ยนสัญญาณประสาทเป็นสัญญาณเคมี โดยหลั่งฮอร์โมนเมลาโทนิน (melatonin) ซึ่งจะส่งข้อความที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของระยะเวลาของแสง (length of the daily photoperiod) ไปยังสมองและอวัยวะต่างๆ ของร่างกายเพื่อควบคุมการทำงาน ดังนั้นคือ เมลาโทนินจะร่วมกับสมองส่วน suprachiasmatic nucleus (SCN) ของ hypothalamus ทำหน้าที่เป็นตัวบอกเวลา (biological clock) แก่ร่างกายว่าตอนนี้เป็นเวลากลางวันหรือกลางคืนก็จะเป็น circadian rhythm pace maker เป็นตัวที่บอกจังหวะเวลากลางวันและกลางคืนแก่ร่างกาย รวมทั้งอาการ jet-lag นอกจากนี้ต่อมไพเนียลและเมลาโทนินยังมีผลเป็นนาฬิกาบอกอายุ (aging clock) เพราะพบว่าระดับเมลาโทนินในช่วงอายุต่างๆ จะไม่เท่ากัน และเชื่อว่าระดับเมลาโทนินนี้เป็นตัวบอกร่างกายว่าร่างกายเราจะถึงวัยใด เช่น เมื่อถึงวัยหนุ่มสาว (puberty) พบว่าระดับเมลาโทนินจะลดลงกว่าเดิมมากและจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงวัยชรา (Cavallo, 1993)

เมลาโทนินมีผลต่อระบบสืบพันธุ์โดยจะทำหน้าที่เป็น antigonadotrophic agent คือยับยั้งการสืบพันธุ์ (Reiter, 1980) ในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งคนด้วย (Reiter, 1991) โดยพบว่าเมลาโทนินจะมีผลโดยผ่านทางวงจรควบคุมที่สมองส่วน hypothalamus ต่อไปยังต่อมใต้สมองและอวัยวะสืบพันธุ์ ที่เรียกว่า hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis ซึ่งในปัจจุบันเชื่อว่าเมลาโทนินไปมีผลควบคุมทั้ง 3 ระดับ เพราะพบ melatonin receptors ที่ median eminence และ preoptic area ของ hypothalamus, ที่ pars tuberalis ของต่อมใต้สมอง (Stankov et. al., 1991) และที่รังไข่และอัณฑะ (Stankov & Reiter, 1990)

นอกจากนี้พบว่าเมลาโทนินมีผลต่อต่อมไร้ท่ออื่นๆ เช่น ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต แม้แต่ต่อมใต้สมอง โดยมีผลในการปรับการสร้างฮอร์โมนของต่อมนั้นๆ ทั้งนี้พบ melatonin receptors ที่ต่อมเหล่านี้ทำให้เชื่อว่าเมลาโทนินมีผลกับต่อมเหล่านี้โดยตรง

เมลาโทนินยังถูกเชื่อว่ามีเกี่ยวข้องกับขบวนการชราภาพ (Maestroni et.al., 1988) โดยเมลาโทนินสามารถช่วยชะลอความแก่ได้ ซึ่งอาจจะเพราะว่า เมลาโทนินเป็นตัวป้องกันการเกิด oxidation (antioxidant) ที่มีประสิทธิภาพมาก (Reiter, 1996) หรือเมลาโทนินมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยที่จะกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-helper และ natural killer (NK) (Song et al, 1993; Maestroni, 1995) นอกจากนี้ ในปัจจุบันมีข้อมูลว่าเมลาโทนินยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดและการ

รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง เชื่อว่าเมลาโท닌สามารถไปลดการเกิดมะเร็งของอวัยวะบางอย่าง เช่น มะเร็งเต้านม (Blask & Hill, 1986; Wilson et. al., 1992) มะเร็งปอด (Lissoni et.al., 1994) มะเร็งทางเดินอาหาร (Lissoni et. al., 1993) เป็นต้น

การทำงานของต่อมไพเนียลและการสร้างเมลาโท닌ถูกควบคุมโดยระบบประสาท โดยระบบประสาทชนิด adrenergic sympathetic เป็นระบบประสาทหลักที่มาควบคุมการสร้างเมลาโท닌 เริ่มต้นจากการรับแสงผ่านเรตินา และแสงจะถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณประสาท และส่งไปยังสมองส่วน hypothalamus ที่เรียกว่า suprachiasmatic nucleus และ paraventricular nucleus ตามลำดับ จากนั้นจะส่งผ่านสัญญาณประสาทไปยังไขสันหลังระดับคอบริเวณ lateral column และที่บริเวณนี้จะมี pre-ganglionic sympathetic neuron ส่งเส้นประสาทไปยังปมประสาท superior cervical ganglion ซึ่งอยู่บริเวณคอและที่ปมประสาทนี้จะมี synapse กับ postganglionic neuron ซึ่งจะส่งเส้นประสาทที่เป็น adrenergic fibers ที่มี noradrenaline เป็นสารสื่อประสาท เข้าสู่ต่อมไพเนียลทางเส้นประสาทชื่อ conarian nerve และเส้นประสาทนี้จะไปสิ้นสุดที่เซลล์ pinealocyte เมื่อมีแสง แสงจะยับยั้งเส้นทางประสาทที่กล่าวมาข้างต้น แต่ในขณะที่ความมืดกระตุ้นและส่งผลให้ปลายประสาท adrenergic fiber หลัง noradrenaline ออกมา noradrenaline นี้จะไปจับกับตัวดักจับ β -adrenergic receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ pinealocyte มีผลกระตุ้นเอนไซม์ adenylate cyclase ซึ่งทำให้ ATP เปลี่ยนเป็น cyclic AMP (cAMP) cAMP มีผลกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ serotonin N-acetyltransferase (NAT) ซึ่งเป็น rate limiting enzyme อีกทีหนึ่ง ทำให้มีการสร้างเมลาโท닌 (Reiter, 1991)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาต่อมามีข้อมูลทำให้มีแนวความเชื่อว่าจะมีระบบประสาทชนิดอื่น นอกเหนือจากระบบ adrenergic sympathetic ที่มีต้นกำเนิดทั้งจากสมอง และปมประสาทอื่นๆ รวมทั้งภายในต่อมไพเนียลเอง มาควบคุมการทำงานของต่อมไพเนียลด้วย (Korf & Møller, 1984; Møller, 1999) ระบบประสาทเหล่านี้ประกอบด้วย ระบบประสาทที่มี classical neurotransmitters ซึ่งได้แก่ ระบบ cholinergic parasympathetic (Phansuwan-Pujito et. al., 1991; 1999a) ระบบ dopaminergic (Govitrapong et al., 1984) ระบบ GABAergic (Rosenstein et. al., 1990, Phansuwan-Pujito et al., 1999b) และระบบประสาทที่มี neuropeptides ชนิดต่างๆ เป็น neurotransmitters ซึ่งได้แก่ ระบบ neuropeptide Yergic (NPYergic) (Zhang et al., 1991), Vasoactive intestinal peptidergic (VIPergic) (Cozzi et al., 1990; Shiotani et al., 1986), opioid peptidergic (Schroder et al, 1988; Møller et al, 1991a; Coto-Montes et al., 1994), substance Pergic (Rønnekleiv & Kelly, 1984; Govitrapong & Ebadi, 1986; Møller et al., 1993), และ somatostatinergic (Møller et al., 1992; Møller et al., 1995)

Neuropeptide Y (NPY) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 ตัว สกัดได้ครั้งแรกจากสมองของหนู (Tatemota, 1982) โมเลกุลของ NPY มีกรดอะมิโนชนิด tyrosine ที่ตำแหน่งปลาย N และ tyrosine amide ที่ตำแหน่งปลาย C และ NPY มีส่วนประกอบด้วยกรดอะมิโนคล้ายกับ pancreatic polypeptide

(PPP) และ peptide YY (PYY) ต่อมาก็ได้มีผู้พบ NPY นี้ทั้งในระบบประสาทส่วนกลาง (Allen et al, 1983; Chronwall et al, 1985) และระบบประสาทส่วนปลาย (Lundberg et al, 1982; Wang et al, 1987) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น รวมทั้ง คน (Adrian et al, 1983) และยังพบว่า โครงสร้างของ NPY ทั้งในหนู คน รวมทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ เหมือนกันมาก (O' Hare et al, 1988) NPY มักพบร่วมกับ (colocalize) noradrenaline ที่ sympathetic ganglion (Lundberg et al., 1982) ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของเส้นประสาทที่ไปควบคุมต่อมไพเนียล จึงทำให้เป็นที่สนใจในการศึกษา รวมทั้ง NPY ยังเป็นสารสื่อประสาทที่พบในเส้นทางเดินประสาทของสมองที่ควบคุมเกี่ยวกับ circadian rhythm ด้วย (Albers & Ferris, 1984; Card & Moore, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อฉีด NPY เข้าทางเส้นเลือดในหนู จะเพิ่ม activity ของ enzyme NAT (Reuss & Schroder, 1987) และเพิ่มระดับเมลาโทนิน (Vacas et al., 1987) ต่อมาได้มีการศึกษาถึงเส้นประสาทชนิด NPY ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ เช่น หนู (Schon et al, 1985; Zhang et al., 1991) แกะ (Cozzi et al, 1992) วัว (Phansuwan-Pujito et al., 1993) แมว (Møller et al., 1994) guinea pig (Schroder & Vollrath, 1986) mink (Møller et al., 1990) พบว่ามีความแตกต่างในปริมาณของเส้นประสาท และแหล่งที่มาของเส้นประสาทชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบ NPY receptor ชนิด Y1 ที่บน pinealocyte membrane ของ หนู (Olcese, 1991)

Vasoactive intestinal peptide (VIP) สร้างมาจาก preproVIP precursor ที่มี กรดอะมิโน 170 ตัว มักพบมากที่เซลล์ประสาทบริเวณ cerebral cortex, amygdala, และ hypothalamus (Fuxe et al., 1977) นอกจากนี้ยังพบที่ปมประสาทบริเวณหัว (Shiotani et al., 1986) ซึ่งจากบริเวณนี้จะส่งเส้นประสาทไปเลี้ยงเส้นเลือดที่เลี้ยงสมอง มีผลในการขยายเส้นเลือด นอกจากนี้ยังมีผลต่อการควบคุมการทำงานของ neuroendocrine organs ด้วย VIP มักพบ colocalize กับ classical neurotransmitter ด้วย โดยเฉพาะ acetylcholine (Lundberg et al., 1982) ดังนั้นจึงเป็นที่สนใจในการควบคุมการทำงานของต่อมไพเนียลโดยระบบอัตโนมัติชนิด parasympathetic สำหรับภายในต่อมไพเนียลนั้นพบเส้นประสาทชนิด VIP ในสัตว์หลายชนิดคือ หนู (Mikkelsen et al., 1987) กระต่ายและแมว (Uddman et al., 1980) แกะ (Cozzi et al., 1990) gerbil (Møller et al., 1985) นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองตัด superior cervical ganglion ออก พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของเส้นประสาทชนิด VIP นี้ (Cozzi et al., 1994) แสดงว่าต้นกำเนิดของเส้นประสาทชนิดนี้ไม่ได้มาจาก superior cervical ganglion การศึกษาต่อมาพบว่าควรจะมาจจาก pterygopalatine ganglion (Shiotani et al., 1986) นอกจากนี้พบ VIP-binding sites ที่ pinealocyte membrane (Møller et al., 1985) VIP มีผลเพิ่มการสร้าง enzyme NAT (Yuwiler, 1987)

Opioid peptides เป็น neuropeptides ที่ฤทธิ์คล้ายสารประเภทฝิ่นพบได้ในสมอง ได้มาจาก precursor 3 ชนิด คือ pro-opiomelanocortin, proenkephalin และ pro-dynorphin (Holtt, 1993) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถตรวจพบได้ในต่อมไพเนียลโดยวิธี radioimmunoassay (Udenfriend & Kilpatrick, 1984; Cherdchu et al., 1989) ต่อมาพบว่าเมื่อฉีด des-tyrosine-gamma-endorphin เข้าได้ผิวหนัง

จะทำให้มีระดับเมลาโทนินเพิ่มสูงขึ้น (Gefferd et al., 1981) และ morphine ยังกระตุ้นการหลั่งของเมลาโทนิน (Esposti et al., 1988; Govitrapong et al., 1992) พบเส้นประสาทชนิดนี้ในต่อมไพเนียลของ quinea pig (Schroder et al., 1988) วัว (Møller et al., 1991) และพบทั้งเส้นประสาทและเซลล์ประสาทในต่อมของคน (Moore & Siboni, 1988) นอกจากนี้ยังพบในเส้นประสาทและ pinealocyte คือใน hamster (Coto-Montes et al., 1994) สำหรับ opioid receptors พบได้ในต่อมไพเนียลวัว (Govitrapong et al., 1992)

Substance P เป็น neuropeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 11 ตัว พบอยู่ทั่วไปทั้งใน CNS และ PNS สำหรับในต่อมไพเนียลพบว่ามี substance P ภายในต่อมไพเนียลและสามารถกระตุ้น adenylate cyclase (Duffy et al., 1975) หลังจากนั้นจึงได้มีการศึกษาพบเส้นประสาทชนิดนี้ในหนู (Rønnekleiv & Kelly, 1984) gerbil (Shiotani et al., 1986) วัว (Møller et al., 1993) นอกจากนี้ยังเชื่อว่าต้นกำเนิดของเส้นประสาทชนิดนี้ที่ไปยังต่อมไพเนียลมาจากปมประสาท trigeminal ganglion (Shiotani et al., 1986) หรือมาจากสมองโดยตรง (Møller et al., 1993) และ พบ substance P binding site ในต่อม ไพเนียลของวัว (Govitrapong & Ebadi, 1986) รวมทั้งพบว่า substance P ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับ enzyme NAT (Ebadi et al., 1989)

Somatostatin เป็น neuropeptide ที่สร้างมาจาก prosomatostatin ที่มีกรดอะมิโน 92 ตัว แล้วจึงแตกให้ somatostatin-14 และ somatostatin-28 โดย somatostatin-14 พบว่าสร้างมาจากต่อมใต้สมองและมีผลในการยับยั้งการหลั่งของ growth hormone (Brazeu et al., 1973) สำหรับในต่อมไพเนียลพบ somatostatin ทั้งในเส้นประสาทของหนู (Finley et al., 1981) วัว (Møller et al., 1992) แกะ (Lew & Lawson-Willey, 1987) และใน pinealocyte ของหนู (Lew & Lawson-Willey, 1987; Møller et al., 1995) มีการรายงานพบว่า somatostatin ในต่อมไพเนียลแสดงลักษณะ circadian rhythm (Webb et al., 1988) และ disulphide bridges ที่พบที่ somatostatin มีผลยับยั้งการสร้าง enzyme NAT (Namboodiri et al., 1981)

จากการศึกษาพบมีระบบประสาทที่มี neuropeptides 5 ประเภทเหล่านี้อยู่ภายในต่อมไพเนียลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ ทั้งที่เป็นสัตว์ทดลองได้แก่ หนู hamster gerbil และในสัตว์ทั่วไป ได้แก่ วัว แมว แกะ ซึ่งลักษณะที่พบจะแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด เช่น neuropeptide ชนิดหนึ่งอาจพบเฉพาะในสัตว์ชนิดหนึ่งไม่ได้พบในทุกชนิด หรือ ในสัตว์ชนิดหนึ่งอาจไม่พบ neuropeptide ชนิดนั้นๆ เลย จึงอาจกล่าวได้ว่า ลักษณะการควบคุมโดยระบบประสาท neuropeptidergic แต่ละชนิดเป็น species specific ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจหาระบบประสาทเหล่านี้ทั้ง 5 ชนิดในต่อมไพเนียลของคนไทย ซึ่งยังไม่มีผู้ใดได้ศึกษาเลย มีแต่ระบบประสาทชนิด opioid peptidergic ที่พบในคนเท่านั้น (Moore & Siboni, 1988)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแสดงว่ามีระบบประสาทนิวโรเปปไทด์ชนิด neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin, substance P และ opioid peptide มาควบคุมการทำงานของต่อมไพลีลของคน โดยวิธี immunohistochemical technique
2. เพื่อแสดงถึงลักษณะของเส้นประสาทชนิดต่างๆ เหล่านี้ รวมทั้งปริมาณและการกระจาย ในต่อมไพลีลของคน
3. เพื่อชี้ถึงต้นกำเนิดของเส้นประสาทชนิดต่างๆ เหล่านี้
4. ผลที่ได้รับจากการวิจัยนี้นำไปสู่ความเข้าใจถึงการควบคุมการทำงานของต่อมไพลีลของคน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

เนื้อเยื่อที่ใช้ทำการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ต่อมไพเนียลของคน ซึ่งได้จากร่างของผู้เสียชีวิตโดยอุบัติเหตุ จากสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ จำนวน 10 คน

สารเคมี

1. สารที่ใช้เป็นหลักใหญ่ในการทำ immunohistochemical technique
 - 1.1 primary antibody ได้แก่ rabbit polyclonal antibody against NPY, neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin, substance P และ opioid peptide ชนิด leu-enkephalin
 - 1.2 secondary antibody ได้แก่ biotinylated swine anti-rabbit IgG (code No. E 353) จากบริษัท Dakopatts
 - 1.3 ABC-streptavidin-horseradish peroxidase complex (code No. E 377) จากบริษัท Dakopatts
 - 1.4 normal swine serum (code No. X 901) จากบริษัท Dakopatts
 - 1.5 3',5'-diaminobenzidine (DAB) จากบริษัท Sigma Chemical Company
2. สารเคมีอื่นๆ ได้แก่
 - 2.1 Na_2HPO_4
 - 2.2 KH_2PO_4
 - 2.3 NaCl
 - 2.4 Tris
 - 2.5 Triton X-100
 - 2.6 paraformaldehyde
 - 2.7 sucrose
 - 2.8 gelatin,
 - 2.9 bovine serum albumin (BSA)
 - 2.10 H_2O_2

วัสดุอุปกรณ์

1. สไลด์แก้ว

2. ชุดเครื่องมือย้อม immunohistochemical method
3. เครื่อง cryostat เพื่อตัดชิ้นเนื้อเยื่อ
4. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
5. ฟิล์มถ่ายภาพ

วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อต่อมไพเนียล

1. นำต่อมไพเนียลของคน มาดองใน 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) ทันที่ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วย buffer
2. นำต่อมไพเนียลแช่ลงใน 20% sucrose in phosphate buffer saline (PBS) เป็นเวลาข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส
3. หลังจากนั้นนำต่อมไพเนียลมาตัด section หนา 20 ไมครอนโดยเครื่อง cryostat และนำ sections ที่ได้ติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วย 0.5% gelatin เก็บสไลด์เหล่านี้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะดำเนินการขั้นตอนต่อไป

วิธีการ Immunohistochemical method

1. นำสไลด์ที่มี tissue sections ติดอยู่มาล้างใน 0.1 M PBS เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง
2. Incubate tissue sections กับ 5% swine serum in PBS-TB (PBS + 0.3% triton X-100 และ 1% BSA) นาน 30 นาที
3. Incubate ต่อกับ 1/4000 antibody against NPY หรือ 1/1000 VIP หรือ 1/1000 somatostatin หรือ 1/1000 substance P หรือ 1/1000 leu-enkephalin นาน 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส
4. ล้างใน PBS-BT (PBS + 0.1% triton X-100, 0.25% BSA) 10 นาที 3 ครั้ง
5. Incubate กับ 1 : 400 biotinylated swine antirabbit IgG นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
6. ล้างใน PBS-BT 10 นาที 3 ครั้ง
7. Incubate กับ ABC-streptavidin-HRP complex นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
8. ล้างใน PBS นาน 10 นาที 2 ครั้ง และ 0.05 M tris นาน 10 นาที ตามลำดับ
9. ทำปฏิกิริยากับ DAB ที่มี 30% H_2O_2 นาน 15 นาที
10. ล้างในน้ำ 5 นาที 2 ครั้ง
11. นำสไลด์มาตากให้แห้ง
12. ปิดสไลด์ด้วย coverglass โดย permount

ศึกษาผล

นำสไลด์ที่ได้จากการทำ immunohistochemical method มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วทำสำเนาปริมาณ และการกระจายของเส้นประสาท NPY, VIP, somatostatin, substance P, leu-enkephalin จากนั้นถ่ายภาพเพื่อรายงานผล

ผลการศึกษา

ลักษณะทั่วไปและจุลกายวิภาคของต่อมไพเนียลของคน

ต่อมไพเนียลของคน มีรูปร่างคล้ายลูกสน ยื่นออกมาอยู่ระหว่าง habenular commissure และ posterior commissure และติดต่อกับส่วนเหล่านี้ด้วย rostral และ caudal pineal stalk ตามลำดับ ต่อมมีขนาดยาววัดจากฐานของต่อมถึงปลายยอดประมาณ 4-6 มิลลิเมตร (ม.ม.) กว้าง 2.5-3 ม.ม. และหนา 3 ม.ม. บริเวณฐานจะติดอยู่กับ third ventricle ในส่วนที่เรียกว่า pineal recess โดยตัวต่อมทั้งหมดจะวางตัวยู่บนสมองส่วน superior colliculus ต่อมมีเยื่อหุ้มสมองชั้น pia คลุมอยู่เรียกว่า pial capsule และพบว่าจะมีเส้นเลือดมาเลี้ยงมาก (รูปที่ 1)

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของต่อมไพเนียลของคน พบว่า pial capsule จะยื่นแทรกเข้าไปในต่อมและกลายเป็น pial septae กันแยกเนื้อของต่อมออกเป็น lobule เล็กๆ (รูปที่ 4B) ซึ่งแต่ละ lobule ประกอบไปด้วยเซลล์ของต่อมไพเนียลที่เรียกว่า pinealocytes มีขนาดประมาณ 5-8 ไมครอน และเซลล์เกี่ยวพันที่อยู่ระหว่าง pinealocyte ที่เรียกว่า interstitial cells ที่มีรูปร่างคล้ายสามเหลี่ยมมีขนาดประมาณ 3-4 ไมครอน นอกจากนี้ยังพบเซลล์ประสาทกระจายอยู่ และพบก้อนหินปูนที่เรียกว่า brain sand กระจายอยู่ทั่วไปของต่อม

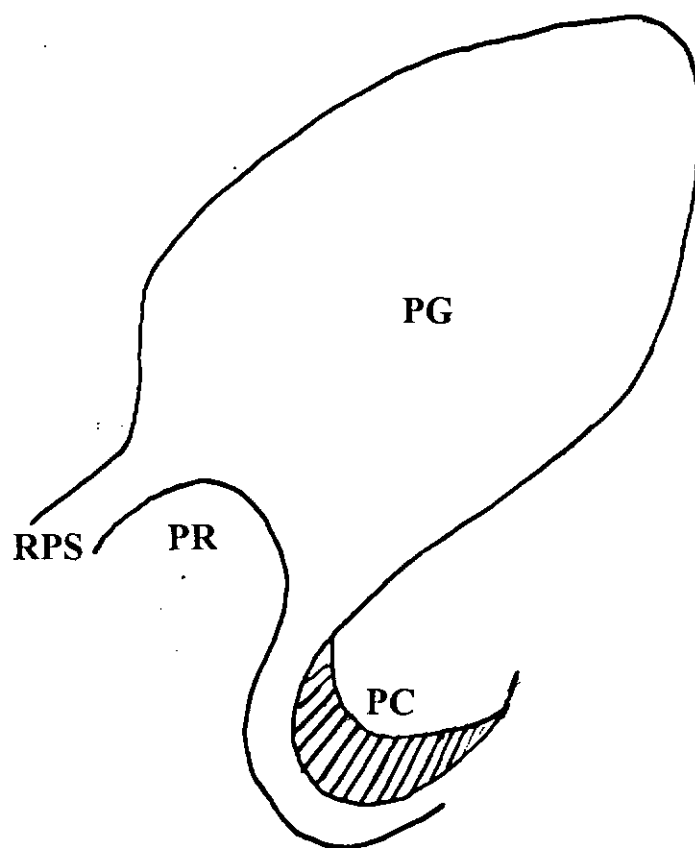
ระบบประสาทนิวโรเปปไทด์ที่พบในต่อมไพเนียลของคน (รูปที่ 2)

เมื่อใช้ antibodies against ต่อ neuropeptide ชนิด NPY, VIP, leu-enkephalin, substance P, และ somatostatin แล้วย้อมด้วย immunohistochemical method พบว่า มีระบบประสาทชนิด NPYergic, Opioidergic, substance Pergic และ somatostatinerbic มาควบคุมการทำงานของต่อมไพเนียลของคน โดยแต่ละชนิดมีปริมาณและการกระจายแตกต่างกัน บางชนิดพบเฉพาะเส้นประสาท บางชนิดพบทั้งเส้นประสาทและเซลล์ประสาท ส่วนระบบประสาทชนิด VIPergic จะไม่พบว่ามาควบคุม

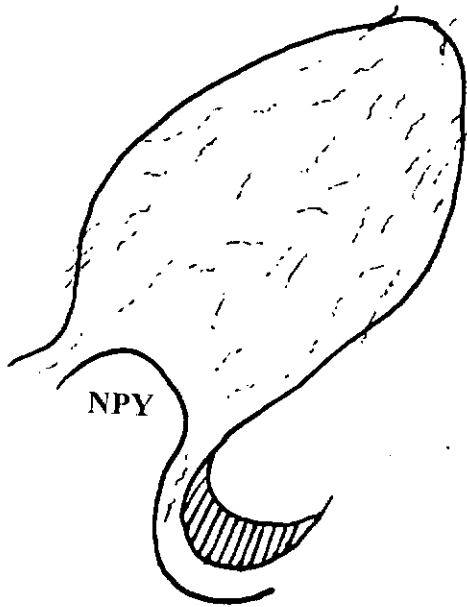
รูปที่ 1 รูปวาดแสดงลักษณะโดยทั่วไปของต่อมไพเนียลของคน

RPS=rostral pineal stalk; PR=pineal recess;

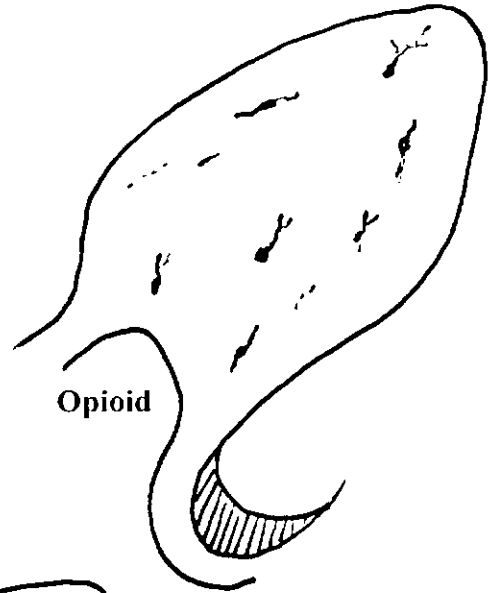
PG=pineal gland; PC= posterior commissure



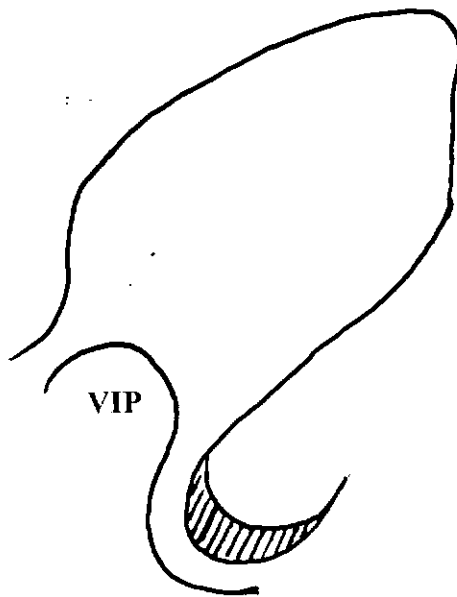
รูปที่ 2 รูปวาดเพื่อเปรียบเทียบปริมาณและการกระจายของเส้นประสาทและเซลล์ประสาทชนิด NPY, opioid, VIP, substance P และ somatostatin ในต่อมไพเนียลของคน



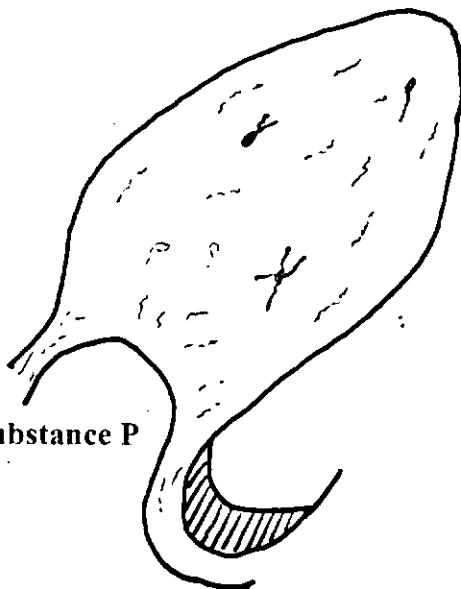
NPY



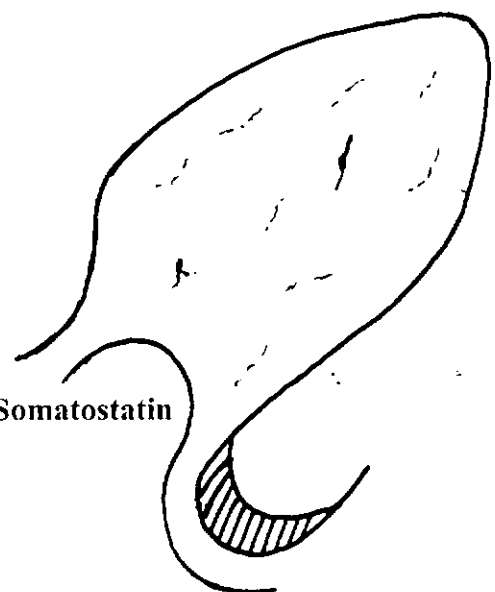
Opioid



VIP



Substance P



Somatostatin

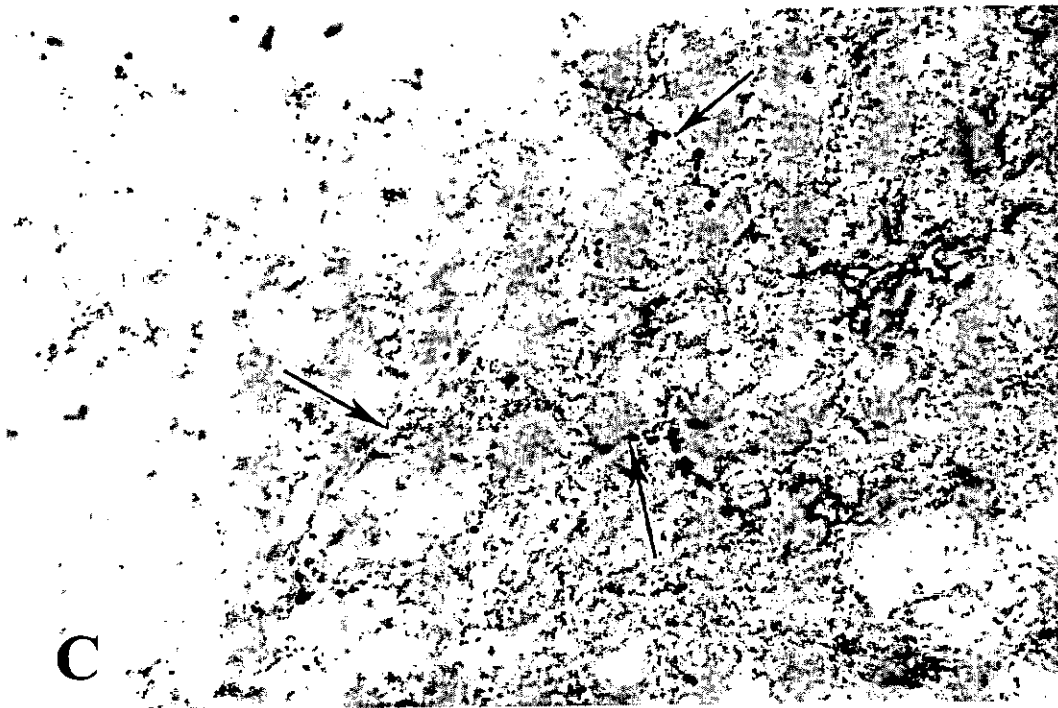
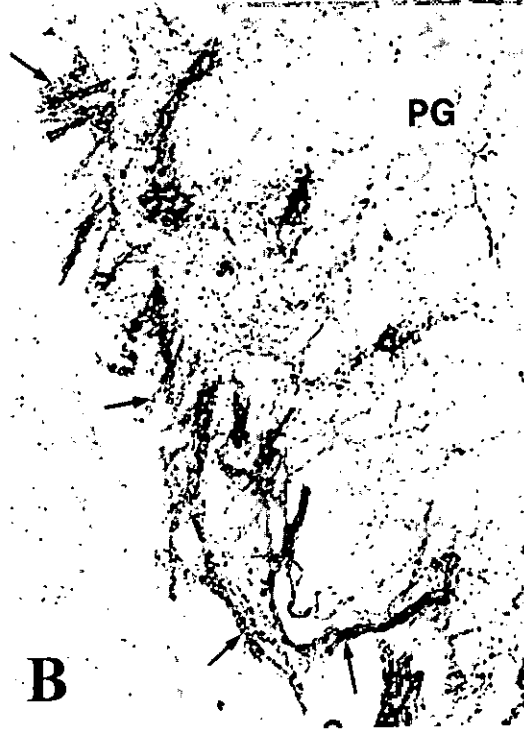
ระบบประสาทชนิด neuropeptide Y (รูปที่ 3)

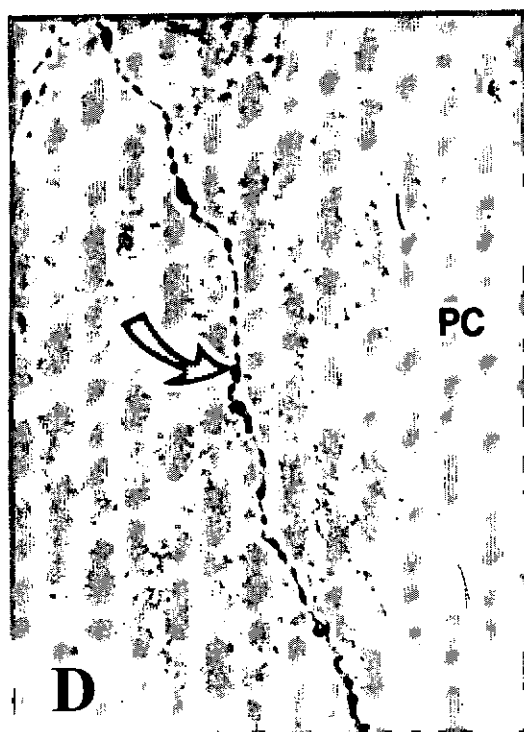
เมื่อใช้ antibody against NPY จะพบเฉพาะเส้นประสาท NPY เท่านั้น ไม่พบเซลล์ประสาท โดยมี ปริมาณของเส้นประสาท NPY จำนวนมาก กระจายไปทั่วต่อม (รูปที่ 2, 3A) พบว่าที่บริเวณรอบนอกของต่อมจะมีปริมาณเส้นประสาท NPY หนาแน่นมากแทรกเข้าสู่ต่อม (รูปที่ 2, 3B) เส้นประสาทเหล่านี้จะเข้ามาอยู่ภายในต่อมกระจายอยู่ระหว่าง pinealocytes ที่เรียกว่า intraparenchymally (รูปที่ 3C) และอาจไปพันอยู่รอบเส้นเลือด ที่เรียกว่า perivascularly (รูปที่ 3E) สำหรับบริเวณ rostral pineal stalk และ caudal pineal stalk พบเส้นประสาท NPYกระจายอยู่ประปราย (รูปที่ 2)

ลักษณะของเส้นประสาท NPY ที่พบในต่อมไพเนียลของคน แสดงลักษณะเหมือนกับเส้นประสาทชนิด peptidergic ทั่วไป คือจะพบ bouton มีลักษณะเป็นจุดติดสีเข้มอยู่เป็นระยะตลอดเส้นประสาท (รูปที่ 3C, 3D) บางครั้งพบ bouton ที่มีลักษณะเป็นปมใหญ่ (รูปที่ 3D)

รูปที่ 3 รูปถ่ายแสดงระบบประสาท NPY ภายในต่อมไพเนียลของคนที่ย้อมด้วย antiserum against NPY โดยวิธี avidin biotin immunoperoxidase

- A, แสดงเส้นประสาท (ลูกศร) ที่กระจายเป็นร่างแหอยู่ทั่วไปในต่อม x 125
- B, แสดงกลุ่มของเส้นประสาท (ลูกศร) ที่แทงเข้าสู่ต่อมไพเนียลที่ขอบของต่อม x 300
- C, แสดงเส้นประสาทขนาดเล็กที่มี bouton like dot ที่กระจายบริเวณ intraparenchyma x 1000
- D, แสดงเส้นประสาทขนาดกลางที่มี bouton like varicosity , PC=pial capsule x 1000
- E, แสดงเส้นประสาทที่อยู่ล้อมรอบเส้นเลือด (V) x 500





ระบบประสาทชนิด opioid (รูปที่ 4)

เมื่อใช้ antibody against leu-enkephalin จะพบทั้งเส้นประสาทและเซลล์ประสาทชนิด leu-enkephalin โดยมีเส้นประสาทในปริมาณน้อย แต่จะมีปริมาณของเซลล์ประสาทชนิด opioid มาก กระจายอยู่ทั้งที่ฐานและส่วนปลายยอดของต่อม (รูปที่ 2, 4A) ลักษณะของเซลล์ประสาทจะมี cell body และส่วน process ยื่นออกมาอาจ 1 หรือ 2 เส้น (รูปที่ 4B,C,D,E,F) โดยลักษณะของ processes เหล่านี้อาจจะใหญ่และเรียบ (รูปที่ 4B,D) หรือเล็กและมีปุ่มค่อนข้างใหญ่อยู่เป็นระยะๆ (รูปที่ 4E,F) เซลล์ประสาทนี้มักพบอยู่บริเวณขอบของ lobule และยื่น process ออกมานอก lobule ไม่พบเซลล์ประสาทชนิดนี้ที่บริเวณขอบๆของต่อม

เส้นประสาทที่พบมักจะเป็น processes ที่ยื่นออกมาจากเซลล์ประสาท ส่วนที่พบแต่เฉพาะ nerve fibers จะน้อย และไม่พบที่บริเวณ pineal stalk

รูปที่ 4 รูปถ่ายแสดงระบบประสาท opioid ภายในต่อมไพนีลของคนที่ย้อมด้วย antiserum against leu-enkephalin โดยวิธี avidin biotin immunoperoxidase

A, แสดงการกระจายของเซลล์ประสาท (ลูกศร) และเส้นประสาท x 50

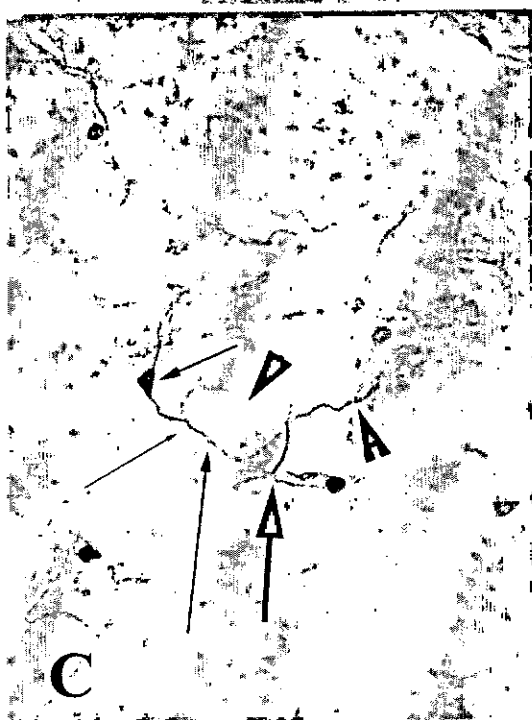
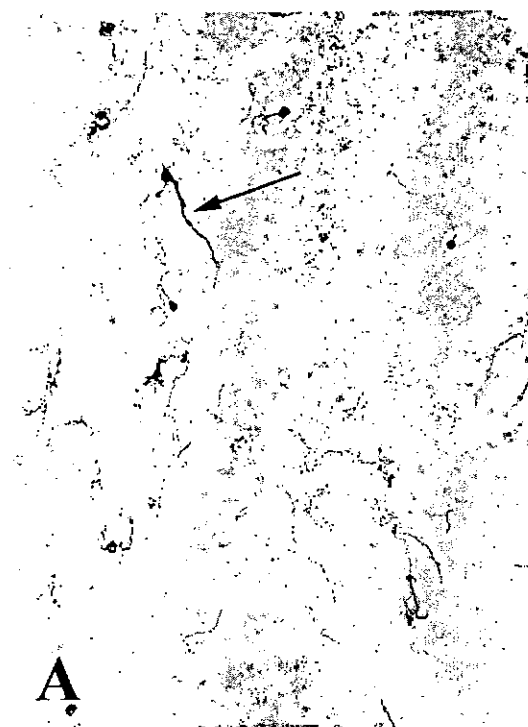
B, รูปขยายของ A (ลูกศร) x 125

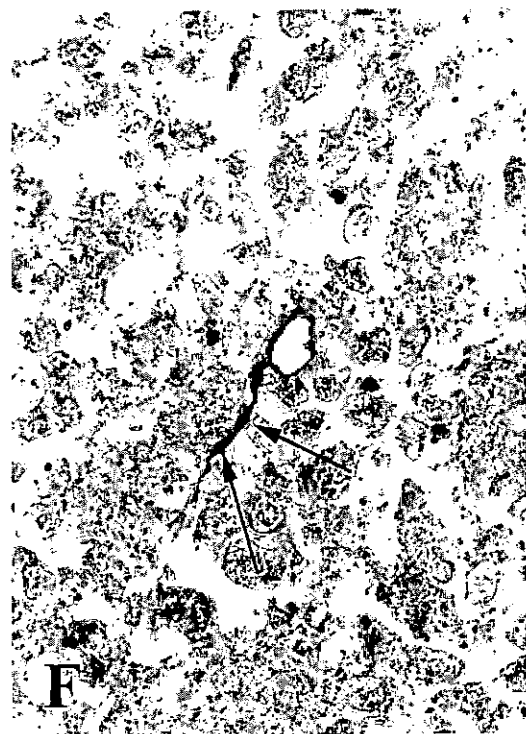
C, แสดงเซลล์ประสาทขนาดเล็กที่ process ยาว (ลูกศร และหัวลูกศร) x 300

D, เซลล์ประสาทที่มี process เรียบ (ลูกศร) x 300

E, เซลล์ประสาทชนิด monopolar neuron ที่มี process เป็น bouton like dot (ลูกศร) x1000

F, เซลล์ประสาทชนิด monopolar neuron ที่มี process เรียบและใหญ่ (ลูกศร) x1000





192683

ระบบประสาทชนิด substance P (รูปที่ 5)

เมื่อใช้ antibody against substance P จะพบทั้งเส้นประสาทและเซลล์ประสาทชนิด substance P ในปริมาณปานกลาง (รูปที่ 2) โดยเส้นประสาทที่พบจะกระจายอยู่ทั่วต่อม แทรกไปอยู่ระหว่าง pinealocyte หรืออยู่ล้อมรอบ pinealocyte ในลักษณะคล้ายร่างแห (รูปที่ 5B) และพบอยู่รอบๆ เส้นเลือดบริเวณ interlobular septa พบส่วนน้อยมากที่ขอบๆ ของต่อมบริเวณ pial capsule

นอกจากนี้ยังพบค่อนข้างมากที่บริเวณฐานของต่อม (รูปที่ 5D) และเลยเข้าไปพบที่ rostral และ caudal pineal stalk ที่ต่อเข้าไปถึงตัวต่อม เส้นประสาทเหล่านี้มีขนาดปานกลาง (รูปที่ 5H) หรือเล็กบาง และมี bouton ที่มีขนาดเล็กคล้ายจุด (รูปที่ 5G) หรือขนาดเป็นปมใหญ่ (รูปที่ 5A)

พบเซลล์ประสาทในปริมาณที่น้อยกว่าเส้นประสาทอยู่ทั่วไป ลักษณะเป็นทั้ง unipolar (รูปที่ 5C), bipolar (รูปที่ 5F) และ multipolar (รูปที่ 5E) neurons

รูปที่ 5 รูปถ่ายแสดงระบบประสาท substance P ภายในต่อมไพเนียลของคนที่ย้อมด้วย antiserum against substance P โดยวิธี avidin biotin immunoperoxidase

A, เส้นประสาทที่มี bouton like varicosity x 1000

B, เส้นประสาทที่พบอยู่ล้อมรอบ pinealocyte (ลูกศร) x 740

C, เซลล์ประสาทชนิด monopolar neuron (ลูกศร) x 1205

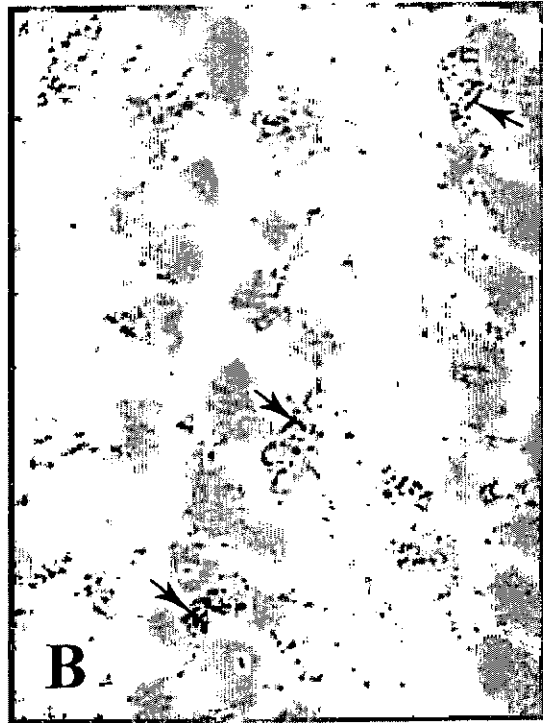
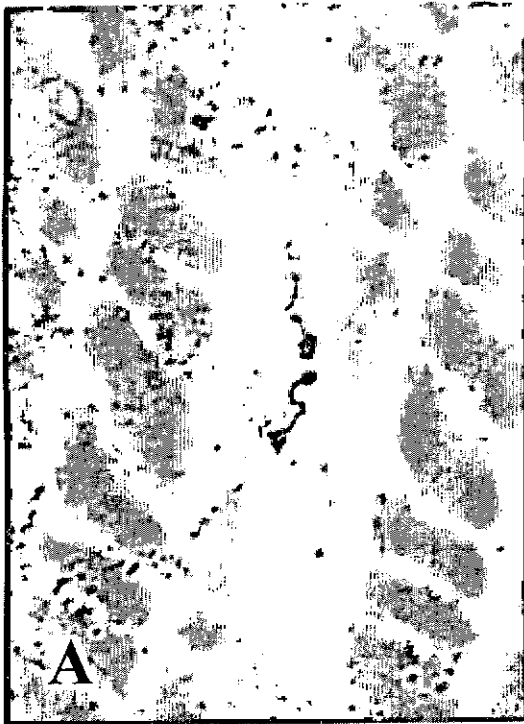
D, เส้นประสาทที่พบอยู่บริเวณฐานของต่อม x 740

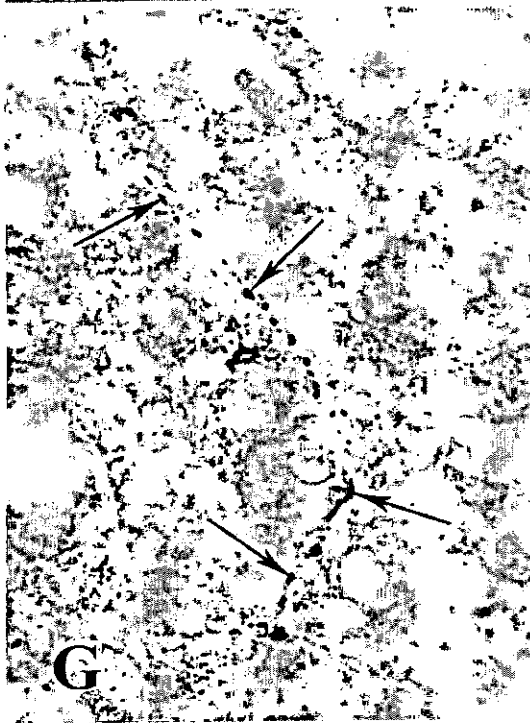
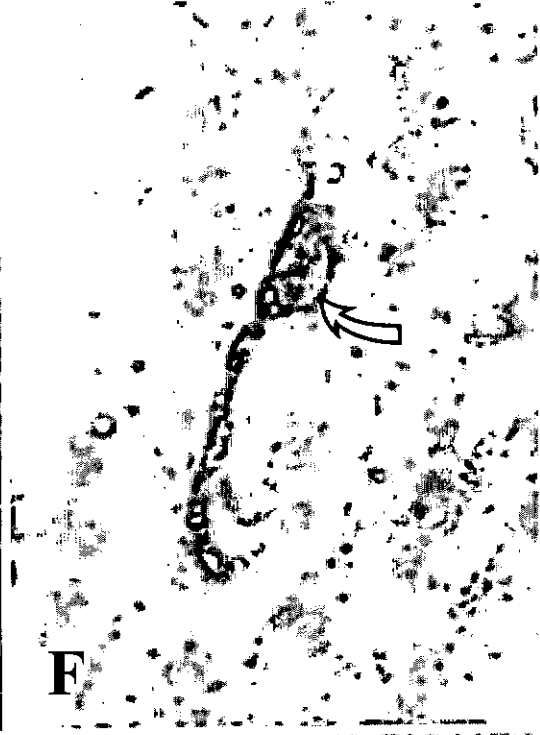
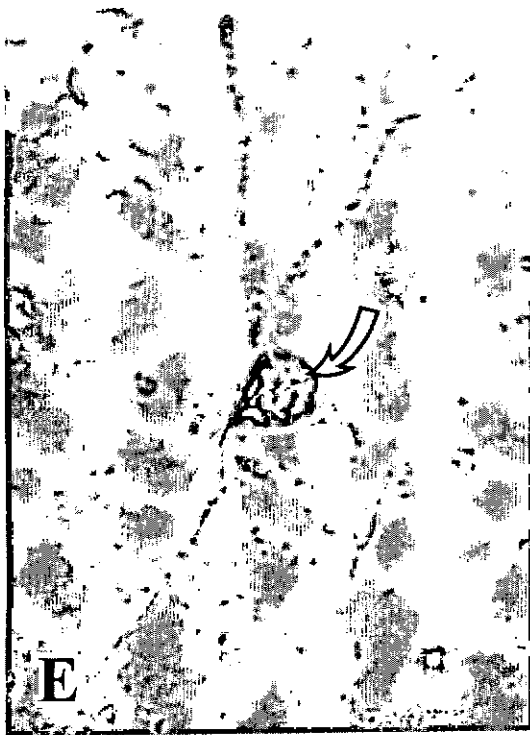
E, เซลล์ประสาทชนิด multipolar neuron (ลูกศร) x 1205

F, เซลล์ประสาทชนิด bipolar neuron (ลูกศร) x 1205

G, เส้นประสาทขนาดเล็กที่มี bouton like dot (ลูกศร) x 1000

H, เส้นประสาทขนาดกลาง (ลูกศร) x 1000





ระบบประสาทชนิด somatostatin (รูปที่ 6)

เมื่อใช้ antibody against somatostatin จะพบทั้งเส้นประสาทและเซลล์ประสาท somatostatin ในปริมาณน้อย (รูปที่ 2, 6A) โดยเส้นประสาทจะพบอยู่ทั้ง intraparenchyma (รูปที่ 6A,B) และ peri-vascula (รูปที่ 6C) และพบที่บริเวณ pial capsule (รูปที่ 6D) บ้าง และแทรกเข้าสู่ต่อม ลักษณะของเส้นประสาทเหล่านี้เช่นเดียวกับ peptidergic nerve fibers ทั่วไป คือ มีขนาดเล็ก และบาง มี boutons อยู่เป็นระยะๆ ทั้งที่คล้ายจุดและเป็นปม (รูปที่ 6B,C,D) นอกจากนี้พบเส้นประสาทขนาดใหญ่และเรียบบ้าง (รูปที่ 6A)

สำหรับเซลล์ประสาทพบปริมาณน้อยเช่นกัน และมักเป็นชนิด bipolar neurons (รูปที่ 6A,E)

รูปที่ 6 รูปถ่ายแสดงระบบประสาท somatostatin ภายในต่อมไพเนียลของคนที่ยอม
ด้วย antiserum against somatostatin โดยวิธี avidin biotin
immunoperoxidase .

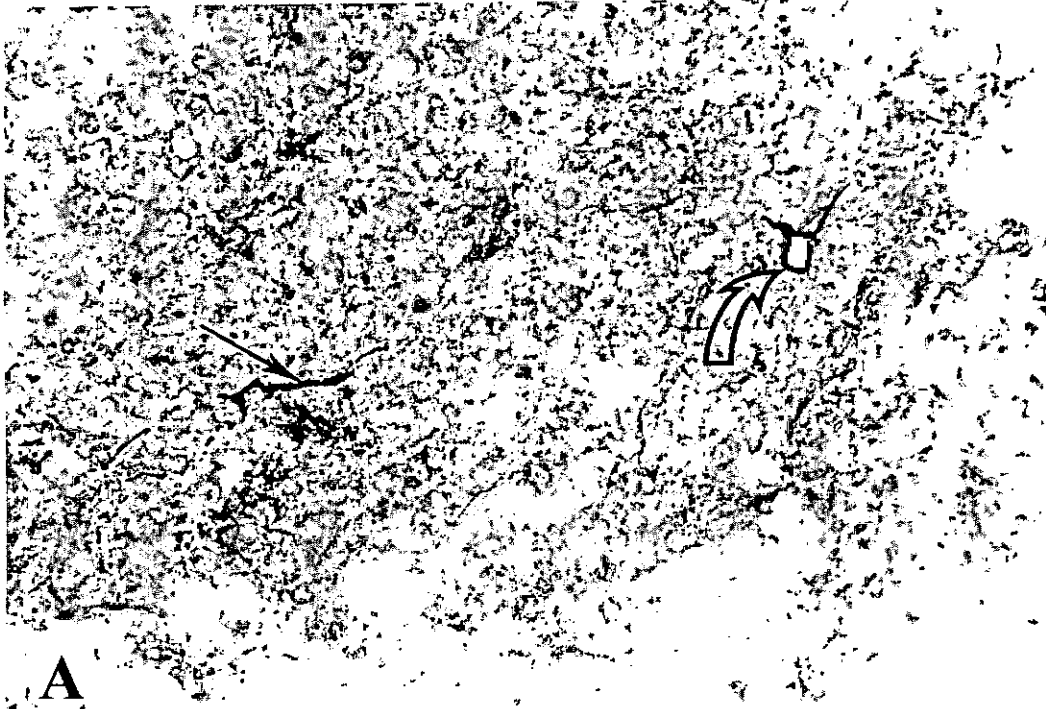
A, แสดงเส้นประสาท (ลูกศร) และเซลล์ประสาท (ลูกศรโค้ง) x 300

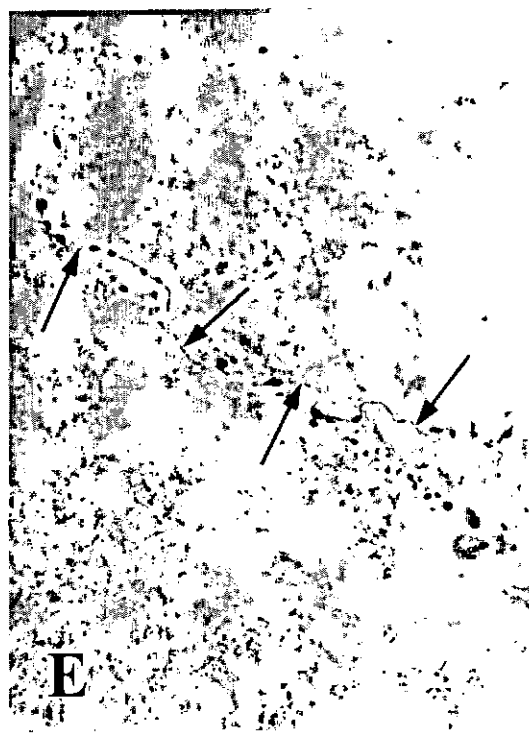
B, เซลล์ประสาทชนิด bipolar neuron (ลูกศรโค้ง) x 740

C, เส้นประสาทที่พบบนกับเส้นเลือด (ลูกศร) x 1000

D, เส้นประสาทที่พบบริเวณ pial capsule (ลูกศรโค้ง) x 740

E, เส้นประสาทขนาดเล็กที่มี bouton like dot (ลูกศร) x 1000





อภิปรายผล

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ต่อมไพเนียลของคนมีระบบประสาทนิวโรเปปไทด์ชนิด NPYergic, opioidergic, substance Pergic และ somatostatinergic มาควบคุมการทำงานของต่อม เช่นเดียวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ทั้งที่เป็นสัตว์ใหญ่และมีลักษณะของต่อมเหมือนคน เช่น วัว (Phansuwan-Pujito et al., 1993; Møller et al., 1991b; Møller et al., 1993; Møller et al., 1992) หรือในสัตว์พวกที่มีลักษณะของต่อมไพเนียลแบ่งเป็น 2 ส่วน superficial และ deep pineal เช่น หนู หรือ hamster (Zhang et al., 1991; Coto-Montes et al., 1994; Rønnekleiv & Kelly, 1984; Møller et al., 1995) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ต่อมไพเนียลของคนไม่มีระบบประสาทชนิด VIPergic มาควบคุม ทั้งๆที่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ทั้งที่มีลักษณะของต่อมไพเนียลแบบเดียวกับคน เช่น แกะ (Cozzi et al., 1990) , กระต่ายและแมว (Uddman et al., 1980) และที่มีลักษณะเหมือนในหนู คือ หนู (Mikkelsen et al., 1987) และ gerbil (Møller et al., 1985)

ระบบประสาทชนิด NPYergic ในต่อมไพเนียลของคนเมื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ พบว่ามีปริมาณและการกระจายใกล้เคียงกับในวัว (Phansuwan-Pujito et al, 1993) แมว (Møller et al, 1994) และ แกะ (Cozzi et al, 1992) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเส้นประสาท NPY ในปริมาณมากที่บริเวณรอบนอกของต่อมไพเนียลของคน ทำให้อาจคาดว่าต้นกำเนิดของเส้นประสาทชนิดนี้มาจากปมประสาท superior cervical ganglion (SCG) ที่ส่งเส้นประสาทชนิด noradrenergic sympathetic fibers มาควบคุมต่อมไพเนียลทางเส้นประสาท conarian nerve และแทรกเข้าสู่ต่อมตามบริเวณขอบของต่อมผ่าน pial capsule เข้ามา โดยที่ปมประสาท (SCG) นี้จะมี NPYergic neurons เช่น ในหนู (Zhang et al, 1991), Mongolian gerbil (Shiotani et al. 1986), แกะ (Cozzi et al, 1992) และแมว (Møller et al, 1994) นอกจากนี้ยังพบเซลล์ประสาทที่มี NPY อยู่ร่วมกับ (colocalize) noradrenaline ด้วย (Lundberg et al., 1982) อย่างไรก็ตามเส้นประสาท NPY ในต่อมไพเนียลของคนอาจมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งอื่นที่เรียกว่า extra-sympathetic origin เนื่องจากในสัตว์บางชนิด เช่น ใน แกะ เมื่อตัด SCG ออกไปแล้วปริมาณเส้นประสาท NPY ยังคงเหมือนเดิม (Cozzi et al, 1992) โดยต้นกำเนิดที่เป็น extrasympathetic origin ของเส้นประสาท NPY ในต่อมของคนนั้น อาจมาจากสมองทั้งนี้ เพราะว่าพบเส้นประสาท NPY ที่บริเวณ rostral และ caudal pineal stalk ซึ่งเส้นประสาทเหล่านี้อาจจะต่อไปยัง habenular area และ posterior commissure ดังนั้นต้นกำเนิดของเส้นประสาท NPY นี้ อาจมาจากส่วน intergeniculate leaflet ของ lateral geniculate body ที่ส่งเส้นประสาทโดยตรงไปยัง ต่อมไพเนียลและตัวมันเองประกอบด้วย NPY neurons (Mikkelsen and Møller, 1990 ; Mikkelsen et

al., 1991) สำหรับหน้าที่ของ NPY ต่อต่อมไพเนียลของคนนั้น อาจคล้ายคลึงกับที่ได้รายงานในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ คือ NPY สามารถยับยั้งการกระตุ้นของ noradrenalin ที่มีต่อการสร้างเมลาโทนิน (Olcese, 1991) ของเซลล์ นอกจากนี้ ยังพบ NPY receptor ชนิด Y1 ที่บน pinealocyte membrane ของ หนู (Olcese, 1991) เมื่อฉีด NPY ในหนู พบว่ากระตุ้นเอนไซม์ NAT ในเวลากลางวันและยับยั้งในเวลากลางคืน (Reuss & Schroder, 1987) แต่ใน culture ovine pinealocytes พบว่า NPY ไม่มีผลต่อ cAMP และการสร้างเมลาโทนิน (Williams et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของ NPY ที่มีต่อการไหลของเลือดในต่อมไพเนียลของกระต่าย พบว่าสามารถลดการไหลของเลือดได้ (Nilsson, 1991)

ระบบประสาท opioidergic ในต่อมไพเนียลคนที่พบว่ามีเซลล์ประสาทอยู่ในจำนวนมาก แต่มีเส้นประสาทในปริมาณน้อยกว่านั้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทเหล่านี้ที่อยู่ภายในต่อมเองเป็นตัวสำคัญในการควบคุมการทำงานของต่อม ซึ่งผลนี้จะต่างกับในสัตว์อื่นๆ ที่พบเฉพาะเส้นประสาท ได้แก่ quinea pig (Schroder et al., 1988) - วัว (Møller et al., 1991a) และกระแต (Phansuwan-Pujito et al., 1998) และพบใน pinealocyte ของ European hamster (Coto-Montes et al., 1994) ดังนั้นสรุปได้ว่า ระบบประสาท opioidergic นี้มีผลในการควบคุมการทำงานของต่อมไพเนียลของคน โดยมีต้นกำเนิดมาจากภายในต่อมเอง คืออาจเป็น postganglionic neuron ของ parasympathetic system หรือเป็นลักษณะ paracrine control สำหรับผลของ opioid peptide นั้น น่าจะมีต่อ pinealocyte โดยตรง ทั้งนี้เพราะพบ opioid receptor sites ที่ pineal membrane ของวัว (Govitrapong et al., 1992) และ pinealocyte membrane (Govitrapong et al., 1998) นอกจากนี้พบ gene expression ของ opioid receptors ชนิด delta และ mu ที่ต่อมไพเนียลของหนู และคน (Chetsawang et al., 1999) สำหรับผลของระบบประสาทชนิดนี้มีรายงานว่าเมื่อฉีด des-tyrosine-gamma-endorphin เข้าได้ฉีพหึ่งจะทำให้มีระดับเมลาโทนินเพิ่มสูงขึ้น (Gefferd et al., 1981) และ morphine ยังกระตุ้นการหลั่งของเมลาโทนิน (Esposti et al., 1988; Govitrapong et al., 1992) รวมทั้งกระตุ้น activity of NAT และเพิ่มการสร้างเมลาโทนินใน rat pineal gland in culture (Govitrapong et al., 1998) และเพิ่มระดับ G-protein ในต่อมของหนู (Chetsawang et al., 1999) นอกจากนี้มีการเสนอว่า opioid อาจมีผลร่วมกับเมลาโทนินในการลดอาการเจ็บปวด ทั้งนี้เพราะในผู้ป่วยจะรู้สึกปวดน้อยลง หรือต้องการยาระงับความปวดน้อยลงในเวลากลางคืน ซึ่งเป็นเวลาที่มีระดับเมลาโทนินสูง (Ebadi et al., 1998) ดังนั้นระบบประสาทชนิดนี้จึงมีความสำคัญ และน่าศึกษาถึงผลอย่างละเอียดต่อไป

ระบบประสาท substance Pergic ในต่อมไพเนียลของคนก็แสดงให้เห็นว่ามีเส้นประสาทมาควบคุมในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับ การตรวจพบสาร substance P นี้ที่ต่อมไพเนียลคนในปริมาณที่มากโดยวิธี radioimmunoassay (Duffy et al., 1975) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณและการกระจายของ

เส้นประสาทนี้กับสัตว์พวก primate อื่นๆ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับในพวกลิง (Rønnekleiv, 1988) และ กระแต (Kado et al., 1999) คือมีปริมาณปานกลางและกระจายอยู่ทั่วไปทั้งที่ intraparenchyma และ perivacula นอกจากนี้พบเส้นประสาทที่บริเวณ pineal stalk เหมือน ในลิง (Rønnekleiv, 1988) และในวัว (Møller et al., 1993) ซึ่งลักษณะเช่นนี้บ่งชี้ว่า ระบบประสาท substance Pergic นี้เป็นแบบ central innervation คือ เส้นประสาทเหล่านี้มีเซลล์ประสาทต้นกำเนิดมาจากสมอง ซึ่งสมองส่วนที่คาดว่าจะเป็นต้นกำเนิดได้แก่ habenular nucleus ในวัว (Møller et al., 1993) และ hypothalamus ในหนู (Shults et al., 1984; Larsen et al., 1991) อย่างไรก็ตามก็ไม่พบเส้นประสาท substance P ที่บริเวณ pineal stalk ใน golden hamster (Shiotani et al., 1989) และกระแต (Kado et al., 1999) ทำให้บอกได้ว่าต้นกำเนิดของเส้นประสาทนี้ควรอยู่นอกสมอง (periphery) และจากการทดลองที่ตัด SCG ออกในสัตว์เหล่านี้แล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลงในปริมาณของเส้นประสาท ทำให้อธิบายได้ว่าเส้นประสาทเหล่านี้ไม่มีต้นกำเนิดมาจาก SCG ที่เรียกว่า extrasympathetic innervation และจากการศึกษาโดยใช้วิธี retrograde transport ร่วมกับ immunohistochemistry ในพวก gerbil (Shiotani et al., 1986) และในหนู (Reuss et al., 1992) ได้ผลว่าต้นกำเนิดน่าจะมาจาก trigeminal ganglion และทอดผ่าน cerebral arteries มาสู่ต่อมไพเนียล (Düring et al., 1990; Reuss, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับที่พบเซลล์ประสาทชนิด substance P ที่ trigeminal ganglion ของคน (Quartu et al., 1992) นอกจากนี้การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่ามี เซลล์ประสาทชนิด substance P ในคน ซึ่งจะไม่พบเซลล์ประสาทนี้ในลิง และกระแต ดังนั้นอาจสรุปว่ามีความแตกต่างของระบบประสาทชนิดนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สรุปได้ว่าระบบประสาทชนิด substance Pergic ในคนนั้นอาจมีต้นกำเนิดมาจากสมอง หรือมาจากภายในตัวต่อมเองซึ่งอาจเป็น postganglionic neuron ของ parasympathetic system สำหรับผลจากการศึกษานี้ที่พบว่ามีเส้นประสาทนี้พันอยู่ล้อมรอบ pinealocytes ชี้ให้เห็นว่า substance P ควรจะมีผลโดยตรงต่อ pinealocyte ทั้งนี้ได้พบ substance P receptor binding sites ที่ต่อมไพเนียลของวัว (Ebadi & Govitrapong, 1987; Govitrapong & Ebadi, 1986) และพบว่า substance P กระตุ้น adenylate cyclase ในคน (Duffy et al., 1975) ในขณะที่ไม่มีผลต่อการสร้าง cAMP ในไพเนียลของหนู (Kaneko et al., 1980) และ basal or norepinephrine-induced stimulation of the activity of NAT ใน pineal gland in culture ของหนู (Govitrapong & Ebadi, 1986) และต่อการสร้างเมลาโทนินในหนู (Mess et al., 1991) รวมทั้ง pinealocytes (Simonneaux, 1995) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของระบบประสาท substance P ต่อไปโดยเฉพาะในคน เพราะระบบประสาทนี้เกี่ยวข้องกับ ความเจ็บปวด

ระบบประสาทชนิด somatostatin ที่พบเส้นประสาทและเซลล์ประสาทในต่อมไพเนียลของคน นั้น ตรงกับการศึกษาที่แสดงว่ามีสารชนิดในคน (Bouras et al., 1987) และในสัตว์อื่นๆ คือ หนู (Finley et al., 1981) วัว (Møller et al., 1992) และแกะ (Lew & Lawson-Willey, 1987) จะพบเฉพาะเส้นประสาทเท่านั้น ส่วนในหนูจะพบ somatostatin ภายใน pinealocyte ด้วย (Lew & Lawson-Willey,

1987; Møller et al., 1995) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้พบเซลล์ประสาทชนิดนี้ในต่อมไพบีเยลคนด้วย จึงแสดงว่ามีความแตกต่างของระบบประสาท somatostatin ที่มาควบคุมการทำงานของต่อมนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมกันเอง ดังนั้นจากการศึกษาคั้งนี้ยังไม่สามารถกล่าวถึงต้นกำเนิดของเส้นประสาทนี้ในคนได้อย่างแน่ชัด มีการรายงานว่า somatostatin ในต่อมไพบีเยลแสดงลักษณะ circadian rhythm (Webb et al., 1988) และ disulphide bridges ที่พบที่ somatostatin สามารถยับยั้งการสร้าง enzyme NAT ได้ (Namboodiri et al., 1981) ดังนั้น somatostatin อาจมีผลในการควบคุมการสร้างเมลาโทนินก็เป็นได้

สรุปผลการศึกษาคั้งนี้ ทำให้รู้ว่าต่อมไพบีเยลของคนถูกควบคุมด้วยระบบประสาทนิวโรเปปไทด์ชนิด NYPerigic, opioidergic, substance Pergic และ somatostatinergic โดยแต่ละชนิดจะมีปริมาณ และการกระจายแตกต่างกัน สำหรับผลของระบบประสาทแต่ละชนิดต่อต่อมในคนนั้น ยังไม่มีใครได้ศึกษาอย่างละเอียด จึงน่าจะทำการวิจัยเพื่อตอบปัญหานี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2542 และขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และ คณะแพทยศาสตร์ที่ได้ให้ความสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจในการสนับสนุน specimens รวมทั้ง Professor Dr. Morten Møller ที่สนับสนุนให้ antibody บางส่วน และให้คำแนะนำตลอดมา

เอกสารอ้างอิง

- Adrian TE, Allen JM, Bloom MA, Ghatei MN, Rossor GW, Roberts TJ, Crow K, Tatemoto K, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 1983;306:584-586.
- Albers HE, Ferris CF. Neuropeptide Y : role in the light dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci Lett* 1984;50:163-168
- Allen JS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 1983;221:877-879.
- Arendt J. Human responses to light and melatonin. *Adv Pineal Res* 1994;8:439-441.
- Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Trans* 1986;21:433-449.
- Bouras C, Magistretti PJ, Morrison JH, Constantinidis J. An immunohistochemical study of pro-somatostatin-derived peptides in the human brain. *Neuroscience* 1987;22:781-800.
- Brazeau P, Vale W, Burges R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973;179:77-79.
- Card JP, Moore RY. Neuropeptide Y localization in the rat suprachiasmatic nucleus and periventricular hypothalamus. *Neurosci Lett* 1988;88:241-246.
- Cavallo A. Melatonin and human puberty : current perspectives. *J Pineal Res* 1993;15:115-121.
- Cherdchu C., Li W, Hexum TD, Ebadi M. [Met5]-enkephalin-like immunoreactivity in the bovine pineal gland. *Neuroendocrinol Lett* 1989; 11:69-74.
- Chetsawang B, Casalotti SO, Phansuwan-Pujito P, Kotchabhakdi N, Govitrapong P. Gene expressions of opioid receptors and G-proteins in pineal glands. *Biochem Biophys Res Comm* 1999;262:775-780.
- Chronwall BM, Dimaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL. The anatomy of neuropeptide Y-containing neurons in the rat brain. *Neuroscience* 1985;15:1159-1181.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G. Melatonin and jet lag : confirmatory result using a simplified protocol. *Bio Psych* 1992;32:705-711.
- Coto-Montes A, Masson-Pevet M, Pevet P, Møller M. The presence of opioidergic pinealocytes in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*): an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 1994;278:483-491.
- Cozzi B, Mikkelsen JD, Merati D, Capsoni S, Møller M. Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactive nerve fibers in the pineal gland of the sheep. *J Pineal Res* 1990;8:41-47.
- Cozzi B, Mikkelsen JD, Ravault J-P, Locatelli A, Fahrenkrug J, Zhang E-T, Møller M. The distribution of peptide histidine-isoleucine (PHI)- and vasoactive intestinal peptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in the sheep pineal glands is not affected by superior cervical ganglionectomy. *J Comp Neurol* 1994;343:72-82.
- Cozzi B, Mikkelsen JD, Revault J-P, Møller M. Neuropeptide Y(NPY) and c-flanking peptide of NPY in the pineal gland of normal and ganglionectomized sheep. *J Comp Neurol* 1992;316:238-250.

- Dawson D, Encel N. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res* 1993;15:1-12.
- Dollins AB, Wurtman RJ, Deng MH. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature and performance. *Proc Nat Acad Sci* 1994;91:1824-1828.
- Duffy MJ, Wong J, Powell D. Stimulation of adenylate cyclase activity in different areas of human brain by substance P. *Neuropharmacology* 1975;14:615-618.
- Düring M von, Bauersachs M, Böhmer B, Veh RW, Andres KH. Neuropeptide Y-and substance P-like immunoreactive nerve fibers in the rat dura mater encephali. *Neuropharmacol Anat Embryol* 1990;182:363-373.
- Ebadi M. Regulation of the synthesis of melatonin and significance to neuroendocrinology. In : *The pineal gland*. RJ.Reiter, eds. Raven Press, New York. 1984:1-37.
- Ebadi M, Govitrapong P. High affinity [3 H]substance P binding site and its function in the pineal organ. In: *Adv Pineal Res*. RT. Reiter, F. Fraschini, eds. Libbey, New York 1987:81-95.
- Ebadi M, Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P, Nelson F, Reiter RJ. Pineal opioid receptors and analgesic action of melatonin. *J Pineal Res* 1998;24:193-200.
- Ebadi M, Hexum TD, Pfeiffer RF, Govitrapong P. Pineal and retinal peptides and their receptors. *Pineal Res Rev* 1989;7:1-156.
- Esposti D, Esposti G, Lissoni P, Parravicini L, Fraschini F. Action of morphin on melatonin release in the rat. *J Pineal Res* 1988;5:35-39.
- Finley JCW, Maderdrut JL, Roger LJ, Petrusz P. The immunohistochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1981;6:2173-2192.
- Fuxe K, Hokfelt T, Said SI, Mutt V. Vasoactive intestinal polypeptide and the nervous system: immunohistochemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1977;5:241-246.
- Gefferd M, Gaffori O, Chaveau J, Muyard J.P, Lemoal M. Dramatic increase in pineal gland melatonin levels in the rat after subcutaneous injection of des-tyrosine gamma-endorphin. *Neurosci Lett* 1981;27:329-334.
- Govitrapong P, Ebadi M. Studies on high-affinity [3 H]substance P binding site in bovine pineal gland. *Endocr Res* 1986;12: 293-304.
- Govitrapong P, Holtt V. Opioid peptide genes : structure and regulation. *Recombinant DNA technologies in neuroendocrinology* In : *Current topics in neuroendocrinology*. H. Imura, eds. Springer, Berlin. 1993:63-95.
- Govitrapong P, Jitjaijamjang W, Chetsawang B, Phansuwan-Pujito P, Ebadi M. Existence and function of opioid receptors on mammalian pinealocytes. *J Pineal Res* 1998;24:201-208.
- Govitrapong P, Pariyanonth M, Ebadi M. The presence and actions of opioid receptors in bovine pineal gland. *J Pineal Res* 1992;13:124-132.
- Govitrapong P, Murrin LC, Ebadi M. Characterization of dopaminergic receptor sites in bovine pineal gland. *J Pineal Res* 1984;1:215-226.

- Kado M, Yoshida A, Hira Y, Sakai Y, Matsushima S. Light and electron microscopic immunocytochemical study on the innervation of the pineal gland of the tree shrew (*Tupaia glis*), with special reference to peptidergic synaptic junctions with pinealocytes. *Brain Res* 1999;842:359-75.
- Kapper BA. Survey of the innervation of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organ of the vertebrates. *Prog Brain Res* 1976;10:87-153.
- Korf HW, Møller M. The innervation of the mammalian pineal gland with special reference to central pinealopetal projections. *Pineal Res rev* 1984;2:41-86.
- Larsen PJ, Møller M, Mikkelsen JD. Efferent projections from the periventricular and medial parvocellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat. A Phaseolus-vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *J Comp Neurol* 1991;306:462-479.
- Lew GM, Lawson-Willey A. An immunohistochemical study of somatostatin in the ovine, porcine and rodent pineal gland. *Histochemistry* 1987;86:591-593.
- Lissoni P, Barni S, Maestroni GJ. Immunotherapy with subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal indole melatonin as a new effective therapy in advanced cancers of the digestive tract. *Brit J Cancer* 1993;67:1404-1407.
- Lissoni P, Meregalli S, Barni S, Frigerito F. A randomized study of immunotherapy with low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin vs chemotherapy with cisplatin and etoposide as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Tumori* 1994;80:464-467.
- Little KY, Kirkman JA, Duncan GE. Beta-adrenergic receptor subtypes in human pineal gland. *J Pineal Res* 1996;20:1-6.
- Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom S, Goldstein M. Neuropeptide Y like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 1982;116:477-480.
- Maestroni GJ. T-helper-2 lymphocytes as peripheral target of melatonin signaling. *J Pineal Res* 1995;18:84-89.
- Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. *Ann New York Acad Sci* 1988;521:140-148.
- Mess B, Csernus V, Rekasi Z. The role of different neurotransmitters and neuropeptides in the regulation of pineal hormone secretion. A dynamic in vitro study. In: *Adv Pineal Res*. A. Foldes, R.J. Reiter, eds. Libbey, London. 1991: 57-66.
- Mikkelsen JD, Korf HW, Møller M. Vasoactive-intestinal peptide (VIP) in the pineal gland of the rat. In: *Fundamentals and clinics in pineal research*. G. Trentini, C. DeGaetani, P. Pevet, eds. Raven Press, New York. 1987:87-90.
- Møller M. Introduction to mammalian pineal innervation. *Micro Res Tech* 1999;46:235-238.
- Møller M, Cozzi B, Schroder H, Mikkelsen JD. The peptidergic innervation of the mammalian pineal gland. In: *Trentini GP, DeGaetani C, Pevet P. : Fundamentals and clinical in pineal research*. Raven Press, New York. 1987:71-77.

- Møller M, Holst JJ, Mato E, Webb S, Mikkelsen JD. Presence of somatostatin-containing neuronal-like cells in the rat pineal gland. *Neuroendocrinol Lett* 1995;17:71-80.
- Møller M, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J, Korf HW. The presence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like-immunoreactive nerve fibers and VIP-receptors in the pineal gland of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). An immunohistochemical and receptor-autoradiographic study. *Cell Tiss Res* 1985;241:333-340.
- Møller M, Mikkelsen JD, Martinet L. Innervation of mink pineal with neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers. An experimental immunohistochemical study. *Cell Tiss Res* 1990;261:477-483.
- Møller M., Mikkelsen JD, Phansuwan-Pujito P. Demonstration of nerve fibers immunoreactive to met-enkephalin and b-endorphin in the bovine pineal gland. In : Role of melatonin and pineal peptides in neuroimmunomodulation. F. Fraschini, R. Reiter, eds. Plenum Press, New York. 1991a:15-25.
- Møller M, Mikkelsen, JD, Holst JJ, Phansuwan-Pujito P. Somatostatin and prosomatostatin immunoreactive nerve fibers in the bovine pineal gland. *Neuroendocrinol* 1992;56:278-283 .
- Møller M, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P, Schmidt P. Indications for a central innervation of the bovine pineal gland with substance P-immunoreactive nerve fibers. *Brain Res* 1993;611:347-351.
- Møller M, Ravault J-P, Cozzi B, Zhang ET, Phansuwan-Pujito P, Larsen PJ, Mikkelsen JD. The multineuronal input to the mammalian pineal gland. *Adv Pineal Res* 1991b;6:3-12.
- Møller M, Phansuwan-Pujito P, Pramualkijja S, Kotchabhakdi N, Govitrapong P. Innervation of the cat pineal gland by neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers. An experimental immunohistochemical study. *Cell Tiss Res* 1994;276:545-550.
- Moore RY, Siboni P. Enkephalin-like immunoreactivity in neurons in the human pineal gland. *Brain Res* 1988;457:395-398.
- Mori N, Aoyama H, Mori W. anti-hypercholesterolemic effect of melatonin in rats. *Japanese Soc Pathol* 1989;39:613-618.
- Muller-Wieland D, Behnke B, Krone W. Melatonin inhibits LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 1994;203:416-421.
- Nambodiri MAA, Favilla JT, Klein DC. Pineal N-acetyltransferase is inactivated by disulfide containing peptides; insulin is the most potent. *Science* 1981;213:571-573.
- Nilsson SF. Neuropeptide Y (NPY) : a vasoconstrictor in the eyes, brain and other tissues in the rabbit. *Acta Physio Scand* 1991;141:455-467
- O'Hare MMT, Tenmoku S, Aakerlund L, Hilsted L, Johnsen A, Schwartz TW. Neuropeptide Y in guinea pig, rabbit, rat and man. Identical amino acid sequence and oxidation of methionine-17. *Regul Peptides* 1988;20:293-304.
- Olcese J. Neuropeptide Y : an endogenous inhibitor of norepinephric-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J Neurochem* 1991;7:943-947.
- Phansuwan-Pujito P, Jitjaijamjang W, Ebadi M, Govitrapong P, Møller M. Opioidergic innervation of the tree shrew pineal gland : An immunohistochemical study. *J Pineal Res* 1998;24:209-214.

- Phansuwan-Pujito P, Mikkelsen JD, Govitrapong P, Møller M. A cholinergic innervation of the bovine pineal gland visualized by immunohistochemical detection of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactive nerve fibers. *Brain Res* 1991;545:49-58.
- Phansuwan-Pujito P, Møller M, Govitrapong P. Cholinergic innervation and function in the mammalian pineal gland. *Micro Res Tech* 1999;46:281-295.
- Phansuwan-Pujito P, Pramualkijja S, Govitrapong P, Møller M. An immunohistochemical study of neuropeptide -Y in the bovine pineal gland. *J Pineal Res* 1993;15:53-58.
- Phansuwan-Pujito P, Thammikul S, Sithigorngul P. The amino acids neurotransmitter innervation in the human pineal gland. In: 8th meeting of the european pineal society. Tours. 1999:80.
- Quartu M, Diaz G, Floris A, Lai ML, Priestley JV. Calcitonin gene-related peptide in the human trigeminal sensory system at developmental and adult life stages : immunohistochemistry, neuronal morphometry and coexistence with substance P. *J Chem Neuroanat* 1992;5:143-157.
- Reiter RJ. The pineal and its hormone in the control of reproduction in the mammals. *Endocr Rev* 1980;1:109-131.
- Reiter RJ. Pineal gland : interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol Metabol* 1991;2:13-19.
- Reiter RJ. Functional diversity of the pineal hormone melatonin : its role as an antioxidant. *Exp Clin Endocrinol* 1996;104:10-16.
- Reuss S. Trigeminal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech* 1999;46: 305-309.
- Reuss S, Reiman R, Vollrath L. Substance P- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive neurons in the rat trigeminal ganglion, with special reference to meningeal and pineal innervation. *Acta Histochem* 1992;92:104-109.
- Reuss S, Schroder H. Neuropeptide Y effects on pineal melatonin synthesis in the rat. *Neurosci lett* 1987;74:158-162.
- Rosenstein RE, Chuluyan HE, Diaz MC, Cardinali DP. GABA as a presumptive paracrine signal in the pineal gland evidence on an intrapineal GABAergic system. *Brain Res Bull* 1990;25:339-344.
- Rønnekleiv OK. Distribution in the macaque pineal of nerve fibers containing immunoreactive substance P, Vasopressin, oxytocin and neurophysin. *J Pineal Res* 1988;5: 259-271.
- Rønnekleiv OK, Kelly MJ. Distribution of substance P neurons in the epithalamus of the rat : an immunohistochemical investigation. *J Pineal Res* 1984;1:355-379.
- Schon F, Allen JM, Yeats JC, Allen YS, Ballesta J, Polak J, Kelly JS, Bloom SR. Neuropeptide Y innervation of the rodent pineal gland and cerebral vessels. *Neurosci Lett* 1985;57:65-71.
- Schroder H, Vollrath. Neuropeptide Y (NPY)- like immunoreactivity in the guinea pig pineal organ. *Neurosci lett* 1986;63:285-289.
- Schroder H, Wsihe E, Nohr D, Vollrath L. Immunohistochemical evidence for the presence of peptides derived from proenkephalin, prodynorphin and proopiomelanocortin in the guinea pig pineal gland. *Histochemistry* 1988;88:333-341.

- Shiotani Y, Jin KL, kawai Y, Kiyama H. Immunohistochemical studies on the innervation of the mammalian pineal gland. In: Adv Pineal Res. RJ. Reiter, S.F. Pang eds. Libbey, London. 1989:49-54.
- Shiotani Y, Yamano M, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I. Distribution and origins of substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett* 1986;7:187-192.
- Shults CW, Quirion R, Chronwall B, Chase TN, O'Donohue TL. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *peptides* 1984;5:1097-1128.
- Simonneaux V. Neuropeptides of the mammalian pineal gland. *Neuroendocrinol* 1995;17:115-130.
- Song L, Ho Kim Y, Adler WH. Age-related effects in T cell activation and proliferation. *Exp Gerontol* 1993;28:313-321.
- Stankov B, Reiter RJ. Melatonin receptors : current status, facts and hypotheses. *Life Sci* 1990;46:971-982.
- Stankov B, Fraschini F, Reiter RJ. Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res Rev* 1991;16:245-256.
- Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1982;79:5485-5489.
- Uddman R, Almets J, Hakanson R, Loren I, Sundler F. Vasoactive intestinal peptide (VIP) occurs in nerves of the pineal gland. *Experientia* 1980;36:1119-1120.
- Udenfriend S, Kilpatrick DL. Proenkephalin and products of its processing; chemistry and biology. In : Analysis, synthesis, biology. S. Udenfriend, J. Meinhofer, eds. Academic Press, New York. 1984:25-28.
- Vacas MI, Keller MI, pereyra EN, Etchegoyen G, Cardinali DP. In vitro effect of neuropeptide Y on melatonin and norepinephrine release in rat pineal gland. *Cell Molec Neurobiol* 1987;7:309-315.
- Wang YN, McDonald JK, Wyat RJ. Immunocytochemical localization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in adrenergic neurons of the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 1987;8:145-151.
- Webb SM, Perinado MA, Puig ML, Viader M, Reiter RJ. Rhythms in pineal immunoreactive somatostatin in the syrian hamster, mouse and gerbil. *J Pineal Res* 1988;5:273-278.
- Wilson ST, Blask DE, Lemus-Wilson AM. Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. *J Clin Endocrin Metabol* 1992;75:669-70.
- Williams LM, Morgan PJ, Pelletier G, Riddoch GI, Lawson W, Davidson GR. Neuropeptide Y (NPY) innervation of the ovine pineal gland. *J Pineal Res* 1989;7:345-353.
- Yuwiler A. Synergistic action of postsynaptic alpha-adrenergic receptor stimulation on vasoactive intestinal polypeptide-induced increase in pineal N-acetyltransferase activity. *J Neurochem* 1987;49:806-811.
- Zhang E-T, Mikkelsen JD, Møller M. Tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal gland complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res* 1991;265:63-71.