

บทบาทของระบบแอนจิโอเทนซินต่อระดับ ไนตริก ออกไซด์ซินเทสที่ไต
และการสร้างไนตริกออกไซด์ ในหนูแรทที่มีภาวะอดกั้นท่อไตข้างเดียว

นางสาว จินตนา ตันหยง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสารวิทยา (สหสาขาวิชา)

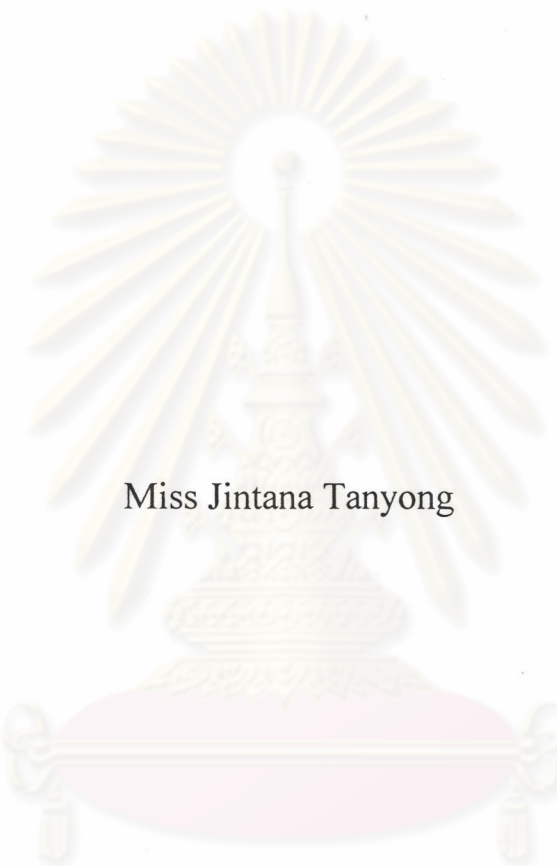
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4413-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ROLE OF ANGIOTENSIN SYSTEM ON RENAL NITRIC OXIDE
SYNTHASE AND NITRIC OXIDE PRODUCTION IN UNILATERAL
URETERAL OBSTRUCTIVE RAT



Miss Jintana Tanyong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Physiology (Inter-department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4413-7

Copyright of Chulalongkorn University

จินตนา ตันหยง: บทบาทของระบบแองจิโอเทนซินต่อระดับไนตริกออกไซด์ซินเทสที่ไต และการสร้างไนตริก ออกไซด์ ในหนูแรทที่มีภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว (Role of Angiotensin System on Renal Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production in Unilateral Ureteral Obstructive Rat) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. สมจิตร เอี่ยมอ่อง, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ 93 หน้า ISBN 974-17-4413-7

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาบทบาทของระบบแองจิโอเทนซินต่อระดับไนตริกออกไซด์ซินเทสที่ไต และการสร้างไนตริกออกไซด์ ในภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว รวมทั้งศึกษาบทบาทของแองจิโอเทนซินต่อภาวะดังกล่าว โดยทำการทดลองในหนูแรทพันธุ์วิสตา ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม sham (S) และกลุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว (UUO) ซึ่งกลุ่มนี้จะถูกแบ่งออกเป็นอีก 3 กลุ่มย่อย (n= 8) คือ 1) ได้รับน้ำดื่มเพียงอย่างเดียว 2) ได้รับน้ำดื่มผสม angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI: Enalapril[®]: 200 mg/L) และ 3) ได้รับน้ำดื่มผสม angiotensin II receptor type 1 antagonist (ARA: Losartan[®]: 500 mg/L) สัตว์ทดลองจะได้รับสารดังกล่าว 1 วัน ก่อนการผ่าตัดทำ S หรือ UUO และรับต่อไปอีกเป็นเวลา 1 วัน หรือ 7 วัน ตามกลุ่มการทดลอง เมื่อครบกำหนดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ และเลือด วัดระดับไนโตรที่เพื่อวัดการสร้างไนตริก ออกไซด์ อิเล็กโทรไลต์ BUN ครีเอตินิน (Cr) และ C_{Cr} รวมทั้งเก็บตัวอย่างเนื้อไต เพื่อตรวจหาเอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทส (endothelial nitric oxide synthase) โดยวิธี immunohistochemistry และตรวจระดับการทำลายเนื้อไต ด้วยวิธี Periodic Acid-Shift reaction (PAS) และ Masson's trichrome technique ผลการทดลองพบว่า เมื่อครบกำหนดการทดลอง 1 วัน และ 7 วัน ในกลุ่ม UUO จะมีระดับเอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ ซินเทส ที่เยื่อบุหลอดเลือด และไกลเมอรูลัสเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม S ในกลุ่ม UUO 1 วันที่ได้รับ ACEI หรือ ARA ร่วมด้วย พบว่าระดับเอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทสจะลดลง ในขณะที่กลุ่ม 7 วัน ค่าระดับเอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทส จะคงที่ในส่วน cortex แต่จะมีระดับเพิ่มขึ้นอีกในส่วน medulla เมื่อได้รับ ACEI หรือ ARA ระดับซีรัมไนโตรที่ของกลุ่ม UUO 1 วัน และ 7 วัน มีค่าเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ (P< 0.05) ซึ่ง ACEI และ ARA สามารถลดระดับดังกล่าวให้ใกล้เคียงกับกลุ่ม S ส่วนระดับการทำลายเนื้อไตในกลุ่ม UUO 1 วัน พบว่าหลอดเลือดขยายกว้าง และมี cell infiltration บางส่วน เมื่อให้ ACEI หรือ ARA สามารถลดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ในขณะที่ UUO 7 วัน จะพบพยาธิสภาพมากขึ้น ซึ่ง ACEI สามารถลดระดับการทำลายดังกล่าวได้ดีกว่า ARA ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติของค่า อิเล็กโทรไลต์ Cr, BUN หรือ C_{Cr} ในสัตว์ทดลอง ที่ทำการศึกษา ซึ่งค่าดังกล่าวนี้อยู่ในระดับปกติ

ผลการศึกษานี้ เป็นข้อมูลของรูปแบบที่เกิดขึ้นในภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว ว่าการยับยั้งระบบแองจิโอเทนซิน สามารถลด ระดับเอนโดทีเลียลไนตริก ออกไซด์ซินเทสที่ไตได้ในกลุ่ม UUO 1 วันเท่านั้น แต่ไม่สามารถลดระดับเอนโดทีเลียลไนตริก ออกไซด์ซินเทสที่ไตในกลุ่ม UUO 7 วันได้และการยับยั้งระบบแองจิโอเทนซิน สามารถลดการสร้างไนตริกออกไซด์ และพยาธิสภาพของไตที่เกิดขึ้นจากภาวะ อุดกั้นท่อไต

สาขาวิชา..... สรีรวิทยา
ปีการศึกษา..... 2546
ลายมือชื่อนิสิต..... จินตนา ตันหยง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ. อึ้งอ่อง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ. ดร. ปานสิริ

4389060820: MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION/ ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR/ ANGIOENTENSIN II RECEPTOR TYPE 1 ANTAGONIST/NITRIC OXIDE SYNTHASE

JINTANA TANYONG: ROLE OF ANGIOTENSIN SYSTEM ON RENAL NITRIC OXIDE SYNTHASE AND NITRIC OXIDE PRODUCTION IN UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTIVE RAT. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SOMCHIT EIAM-ONG, PH.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PANSIRI PHANSUWAN, PH.D. 93 pp. ISBN 974-17-4413-7

This study was conducted to investigate the role of angiotensin on renal nitric oxide synthase (NOS) protein expression and nitric oxide (NO) production in unilateral ureteral obstruction (UUO). Male Wistar rats were divided into two main groups: sham operation and UUO. In UUO groups, the animals were further divided into 3 subgroups (n= 8 in each group) treated with: 1) water 2) water + angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI; Enalapril[®]; 200 mg/L) (UUO+ACEI) and 3) water + angiotensin II receptor type 1 antagonist (ARA; Losartan[®]; 500 mg/L) (UUO+ARA). The treatment was performed one day before the operation (Sham or UUO) and continuously for 1 day or 7 days after the operation. On each experimental due date, 24-hr urine and blood samples were collected. The serum was stored at -80°C until use for measurement of NO production (nitrite), electrolytes, blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), and Cr clearance (C_{Cr}). The kidneys were removed and fixed for endothelial NOS (eNOS) protein expression and histological study. By immunohistochemistry, the expression of renal eNOS protein showed the staining in glomerulus as well as in renal tubular epithelial cells in both cortex and medulla. UUO for 1 or 7 days caused an increase in eNOS protein expression. Treatment with either ACEI or ARA slightly reduced the expression caused by UUO in 1-day group. However, in 7-day animals, the expression was maintained in cortex and was further increased in medulla after ACEI or ARA administration. One day and seven days after UUO, serum nitrite concentration was significantly increased ($p < 0.05$). The treatment with ACEI and ARA could normalize the heightened nitrite level induced by UUO to be that of the sham animals. The 1-day UUO kidney showed a mild tubular dilatation and some cell infiltration. Both ACEI and ARA could attenuate structural alterations. The 7-day UUO rats demonstrated progressively morphological changes. The ACEI had more effectiveness in reduction of tissue destruction than those of ARA. The values of electrolyte, Cr, BUN or C_{Cr} in all experimental groups were in normal range.

The present data are the evidence of UUO model in that angiotensin blockade could attenuate renal eNOS protein expression in 1-day UUO group but not in 7-day UUO animals. The inhibition of angiotensin system ameliorates increased NO production and nephropathy induced by UUO.

Field of study.....	Physiology.....	Student's signature.....	<i>Jintana Tanyong</i>
Academic year.....	2003.....	Advisor's signature.....	<i>S. Eiam-ong</i>
		Co-advisor's signature.....	<i>Pansiri Phansuwan</i>

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis was carried out successfully through many valuable advice, helpful guidance, suggestion, and intensive review from my advisor, Assistant Professor Somchit Eiam-Ong, Ph.D., Department of Physiology and my co-advisor, Associate Professor Pansiri Phansuwan, Ph.D., Department of Anatomy, Srinakharinwirot University, whom I would like to express my deep gratitude.

My sincere and appreciation is also expressed to Professor Somchai Eiam-Ong, M.D., Udomsri Showpittapornchai, Ph.D., Wipawee Kittikowit, M.D., Ratana Chawanasuntorapoj, M.D., Mr. Preecha Ruangvejvorachai, and Mr. Pongsak Pansin for their suggestions, and techniques in preliminary work.

Grateful acknowledgement is also expressed to Department of Physiology, Department of Pathology, and Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University as well as Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for provision the facilities used in experimental works.

I am also indebted to all experimental rats for their sacrifice which bring me to succeed in my study.

Finally, I am extremely grateful to my family for their love, understanding and encouragement throughout my graduate study. And, I would like to special thank to Miss Yuyen Seujange, Miss Janpen Udom, and all of my friends for their helps and cheerfulness.

There is no doubt that my study could not be completed without the support from The Research Grant, Graduate School, Chulalongkorn University.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATION.....	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	5
III. MATERIALS AND METHODS.....	29
IV. RESULTS.....	37
V. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	55
REFERENCES.....	63
APPENDIX.....	84
BIOGRAPHY.....	93

LIST OF TABLES

TABLES		PAGE
1	The intensity scores of renal eNOS protein expression in cortex and medulla from left (obstruction) and right (non obstruction) kidney of rats.....	38
2	The pathological scores of renal cortex and medulla from left (obstruction) and right (non- obstruction) kidney of rats.....	46
3	Serum level of Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Cr, C _{cr} , BUN and V.....	54
4	The intensity scores of renal eNOS protein expression in cortex and medulla from left (obstruction) and right (non obstruction) kidney of rats in sham, UUO,UUO+ACEI, and UUO+ARA after 1 day or 7 days post UUO. Sections were scored in blinded semiquantitative manner.....	91
5	The pathological scores of renal cortex and medulla from left (obstruction) and right (non obstruction) kidney of rats in sham, UUO, UUO+ACEI, and UUO+ARA after 1 day or 7 days post UUO. Sections were scored in blinded semiquantitative manner.....	92

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURES	PAGE
1	Acute renal hemodynamic response to ureteral obstruction 8
2	Linkage of ANG II receptor type 1 to biochemical processes..... 12
3	Events leading to tissue damage due to ANG II action..... 19
4	Immunohistochemical staining of renal eNOS protein expression in Sham and UUO groups from 1 day and 7 days after UUO..... 39
5	Immunohistochemical staining of renal eNOS protein expression in cortex from 1-day UUO groups..... 40
6	Immunohistochemical staining of renal eNOS protein expression in medulla from 1-day UUO groups..... 41
7	Immunohistochemical staining of renal eNOS protein expression in cortex from 7-day UUO groups 42
8	Immunohistochemical staining of renal eNOS protein expression in medulla from 7-day UUO groups..... 43
9	Serum level of nitrite concentration..... 45
10	Representative PAS-staining tissue sections of renal cortex in Sham, and 1-day UUO groups..... 47

LIST OF FIGURES (cont.)

FIGURES		PAGE
11	Representative PAS-staining tissue sections in renal cortex of left (obstruction) kidney from 1-day UUO groups	48
12	Representative PAS-staining tissue sections in renal medulla of left (obstruction) kidney from 1-day UUO groups	49
13	Representative PAS-staining tissue sections in renal cortex of left (obstruction) kidney from 7-day UUO groups	50
14	Representative PAS-staining tissue sections in renal medulla of left (obstruction) kidney from 7-day UUO groups	51
15	Fractional excretions of Na ⁺ , K ⁺ , and Cl ⁻	53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACEI	Angiotensin converting enzyme inhibitor
ANG II	Angiotensin II
ARA	Angiotensin II receptor type 1 antagonist
AT1	Angiotensin II receptor type 1
BK	Bradykinin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
°C	Degree Celsius
DAG	Diacylglycerol
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ET	Endothelin
GFR	Glomerular filtration rate
G	Gram
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
K _f	Glomerular capillary ultrafiltration coefficient
L-AMMA	N ^G -Methyl-L-arginine
L-NAME	N ^w nitric-L-arginine methyl ester
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mean arterial pressure

LIST OF ABBREVIATIONS (cont.)

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M	Molar
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NO	Nitric oxide
NO ₃ ⁻	Nitrate
NO ₂ ⁻	Nitrite
NOS	Nitric oxide synthase
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
PAS	Periodic Acid-Schiff reaction
PKC	Protein kinase C
PLA2	Phospholipase A2
RBF	Renal blood flow
TNF	Tumor necrosis factor
TGF	Transforming growth factor
UUO	Unilateral ureteral obstruction
μL	Microlitre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย