

บทบาทของแองจิโอเทนซิน 2
ในสมองส่วนซีรีเบลลัมของหนูขาว

นางสาว เขาวลัักษณ์ สุกธีสังข์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต

ภาควิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-402-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014210

๑๑๗๘๘๘๙๙๙

ROLE OF ANGIOTENSIN II IN RAT CEREBELLUM

MISS YAVALAG SUTTHISUNK



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

Department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-402-9



เขาวลัคน์ สุทธิสังข์ : บทบาทของแองจิโอเทนซิน 2 ในสมองส่วนซีรีเบลลัมของหนูขาว (ROLE OF ANGIOTENSIN II IN RAT CEREBELLUM) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร.ภาวิศ ทองโรจน์, 96 หน้า.

แองจิโอเทนซิน 2 เป็นสารเพปไทด์ตัวหนึ่งซึ่งในปัจจุบันพบว่ามิได้อยู่ในระบบประสาทส่วนกลางด้วย จากการศึกษาผลของแองจิโอเทนซิน 2 ต่อเซลล์ประสาทเปอร์กินเจ รวมถึงปฏิกิริยาของสารนี้ต่อสารสื่อประสาท GABA และสารยับยั้งต่างๆ นั้น เชื่อว่าอาจออกฤทธิ์ผ่านทางกลไกการออกฤทธิ์ของ GABA ต่อเซลล์ประสาทเปอร์กินเจ เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการออกฤทธิ์ของแองจิโอเทนซิน 2 ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธีการ 2 วิธีเพื่อสนับสนุนซึ่งกันและกัน วิธีที่ 1 ใช้เทคนิคทางไอออนโทเพอเรติคพบว่าฤทธิ์ของ แองจิโอเทนซิน 2 และ GABA สามารถลดความถี่ของการปลดปล่อยกระแสประสาทของเซลล์ประสาทเปอร์กินเจ และ AOAA ซึ่งเป็นสารยับยั้งของ GABA - keto - glutamic transaminase (GABA - T) จะเสริมฤทธิ์เหล่านี้ด้วย และยังพบว่า การเสริมฤทธิ์ของ AOAA ต่อฤทธิ์ของ แองจิโอเทนซิน 2 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งได้โดย saralasin โดยจะไม่มีผลยับยั้งฤทธิ์ GABA ในขณะที่เคยมีการศึกษาพบว่าฤทธิ์ของ แองจิโอเทนซิน 2 สามารถยับยั้งได้โดย bicuculline เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่ แองจิโอเทนซิน 2 มีผลต่อการหลั่งของ GABA จึงใช้วิธีการเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ทางปริมาณของ GABA ที่หลั่งออกมา โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีที่ 2 เชื่อว่าแองจิโอเทนซิน 2 อาจมีบทบาทเป็น modulator ตัวหนึ่งซึ่งทำให้มีการหลั่งของ GABA มากขึ้นในสมองส่วนซีรีเบลลัมของหนูขาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

YAVALAG SUTTHISUNK : ROLE OF ANGIOTENSIN II IN RAT CEREBELLUM. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PAVICH TONGROACH, Ph.D. 96 PP.

Angiotensin II (AII) , the octapeptide which has found present within the central nervous system, was demonstrated for its action on Purkinje cells (P cells) as well as interaction with gamma-aminobutyric acid (GABA) and its antagonists. It was suggested that AII may act on Purkinje cells via GABA mechanism. To elucidate possible modulatory action of this peptide, two methods have been employed in this study. First, by means of micro-iontophoretic techniques, AII and GABA depressed Purkinje cell discharge and these depressant effects were enhanced by AOAA, the inhibitor of GABA - keto - glutamic transaminase (GABA - T) . AOAA induced enhancement of AII was antagonized by saralasin, AII - antagonist, without any effects on action of GABA, while previous evidence demonstrated that the actions of AII on P cell was also blocked by bicuculline. To elucidate possible effects of AII on the release of endogenous GABA, the second, collection methods using high performance liquid chromatography (HPLC) were performed for quantitative assay of amino acids. It is suggested that modulatory action of AII may be due to potentiation of endogenous release of GABA in the rat cerebellum.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Pavich Tongroach, for his kind advice, guidance, keen interest and constant encouragement throughout this study

I would also like to thank Assistant Professor Chamnan Putrarapanich, Ph,D, of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for his kind help in suggestion in HPLC experiment. I am much thankful to all staff of the Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for providing advice and facilities used in experimental works.

Apart from the financial support, from my parents, this study programme has been made possible partly by Chulalongkorn University Graduate School for granting my partial financial support, to conduct this research, to them, my gratitude goes.

Finally, I would like to extend my appreciation to my parents for their love and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	IV
ENGLISH ABSTRACT.....	V
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
TABLE OF CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	X
LIST OF FIGURES.....	XI
ABBREVIATION.....	XVI
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II MATERIAL AND METHODS.....	18
Part A 1. Electrophysiological Method	18
1.1. Experimental animals and Anesthesia.....	18
1.2. Microiontophoretic techniques	19
1.3. Process of spike data	23
2. The criteria used to Identify Purkinje Cells.....	25
3. DATA Analysis.....	26
Part B	
1. Biochemicalphysiology method	28
1.1. Superfusion method	28

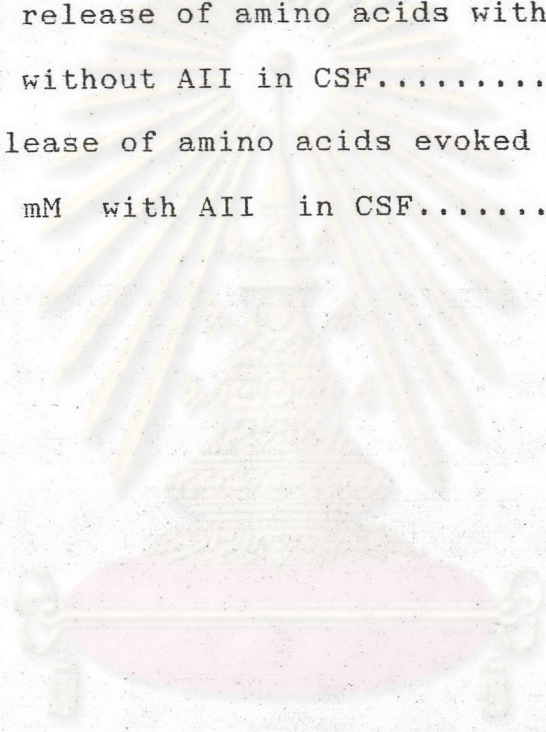
	Page
2. Amino acid assays.....	32
2.1 Reagent and chemicals	33
2.3 Chromatography.....	34
2.4 Derivatization.....	34
III RESULTS.....	38
Part A : Iontophoresis.....	38
1. Response of Purkinje Neurones to A II adminstration.....	38
2. Effects of Iontophoretic Application of A II on Unidentified Cortical Neurones	41
3. Effects of Iontophoretic Application of Amino-oxyacetic acid.....	41
3.1 Effects on the response to iontophoretically applied A II and superimposed by AOAA	43
3.2 Response of Purkinje cells to iontophoretically applied A II, GABA and Gly	43
3.3 Effects on the response to iontophoretically applied excitant amino acids (glutamate and aspartate)	48
4. Effects of Iontophoretic Application of Saralasin, Angiotensin II Antagonist	49

	Page
4.1 Effect of saralasin on the response to iontophoretically applied GABA, Gly and A II.....	49
4.2 Effect of saralasin on AOAA induced potentiation of actions of GABA, Gly and A II.....	51
Part B : Biochemicalphysiology results.	55
1. Amino acid analysis.....	55
2. Perfusion Experiments.....	59
3. Spontaneous release of Endogeneous amino acids.....	59
4. Effect of perfusion with high K^+ solution.....	64
5. Effect of angiotensin II on Amino Acid release.....	64
IV DISCUSSION.....	79
V CONCLUSION.....	84
V REFERENCES.....	86
VI VITA.....	96

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of TABLES

Table	Page
1. Substances used in microiontophoretic study	22
2. Summary of iontophoretic study of AII on cortical neurone of the cerebellum.....	40
3. Evoked release of amino acids with high K^+ 100 mM without AII in CSF.....	65
4. The release of amino acids evoked by high K^+ 100 mM with AII in CSF.....	70



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure	Page
1. Schematic drawing of a neurone demonstrating some differences between a neurone using a "classical" transmitter and a peptide transmitter.....	5
2.A-B Photomicrograph of AII precipitation.....	9
3.A-B Photomicrograph of the cerebellum stained for AII	11
4. basic neuronal circuitry and putative neurotransmitters in the cerebellum	13
5. Wiring diagram of the cerebellar cortex and the brain centers	14
6. Diagramatic representation of experimental arrangements	24
7. Maintained discharge of a Purkinje cell	27
8. Superfusion Push - Pull canula.....	30
9. The flow diagram of high performance liquid Chromatography (HPLC)	36

Figure	Page
10. O - Phthaldehyde (OPA) forms fluorescent derivatives.....	37
11.A-B Effects of iontophoretic administration of AII on spontaneous firing of cerebellar neurone.....	42
12. Effect of microiontophoretic administration of AOAA on response of Purkinje cell to microiontophoretic AII.....	44
13. Effect of microiontophoretic administration of AOAA on response of a Purkinje cell to iontophoretic application GABA, and AII.....	46
14. Effect of microiontophoretic administration of AOAA on responses of a Purkinje cell to iontophoretic application GABA, GLY and AII.....	47
15. Effect of continuous application of AOAA on excitant action of ASP and Glu. on Purkinje cell.....	50

Figure	Page
16. Effect of microiontophoretic application of Angiotensin II antagonist, saralasin on the responses of Purkinje cell to microiontophoretically applied GABA, Gly, and AII.....	52
17. Effect of AII antagonist, saralasin on AOAA induced potentiation of actions of GABA and AII.....	54
18. Chromatogram of OPA - derivatives of Standard amino acids.....	56
19.A-B Standard curve of amino acids measurement.....	57-58
20. Chromatogram of the perfusate sample from the cerebellar cortex.....	60
21. Histology of the rat brain from successful experiment	61
22. Chromatogram of the perfusate sample from incorrect placement.....	62
23. Histology of the rat brain from incorrect placement.....	63

Figure	Page
24.A-B Effects of high concentration of K^+Ca^{2+} stimulated without AII in artificial CSF on the release of endogeneous amino acids from perfusate of rat cerebellar cortex.....	66-68
25.A-B Effects of high concentration of K^+Ca^{2+} stimulated with AII in artificial CSF....	71-73
26.A-B-C-D Concentration of amino acids releasing	74-77
27. Percent changes of the release of endogeneous amino acids in condition of "AII in CSF" compared with "non AII in CSF".....	78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

Ala	=	alanine
AOAA	=	Amino - Oxyacetic acid
ASP	=	aspartic acid
BMC	=	bicuculline
CSF	=	cerebrospinal fluid
°C	=	degree celcius
Fig.	=	Figure
GABA	=	gamma - aminobutyric acid
g	=	gram
Glu	=	glutamic acid
Gln	=	glutamine
Gly	=	glycine
HPLC	=	high - performance liquid Chromatography
I.D.	=	internal diameter
Kg	=	Kilogram
M	=	molar
mg	=	milligram
min	=	minute
mM	=	millimolar
nA	=	nanoamp
nmol	=	nanomole
p	=	probability
P cells	=	Purkinje cells
pmole	=	picomole

S.E.	=	Standard Error
Ser	=	Serine
Tau	=	Taurine
ul	=	microlitre
v/v	=	volume by volume
%	=	percent



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย