

บทบาทของกรดแอล-แอสคอร์บิกต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของไตในหนูขาว  
ที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโตซิน



นางมาเรียม อยู่สุขสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4754-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

199906292

ROLE OF L-ASCORBIC ACID IN RENAL PATHOPHYSIOLOGY  
IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Mrs. Mariem Yusuksawad

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Physiology (Inter-Department)  
Graduate School  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2005  
ISBN 974-17-4754-3

Thesis Title                   ROLE OF L-ASCORBIC ACID IN RENAL  
  PATHOPHYSIOLOGY IN STREPTOZOTOCIN-  
  INDUCED DIABETIC RATS

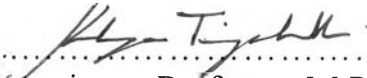
By                                   Mrs. Mariem Yusuksawad

Field of study                 Physiology

Thesis Advisor               Professor Narongsak Chaiyabutr, Ph.D.

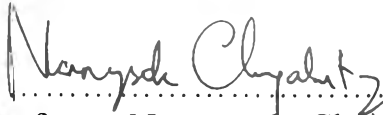
---


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

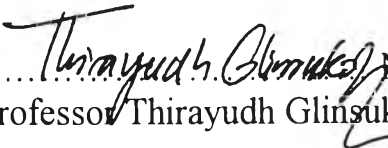
..... Dean of the Graduate School  
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)


#### THESIS COMMITTEE

..... Chairman  
(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

..... Thesis Advisor  
(Professor Narongsak Chaiyabutr, Ph.D.)

..... Member  
(Professor Prasit Futrakul, M.D.)

..... Member  
(Professor Thirayudh Glinsukon, Sc.D.)

..... Member  
(Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.)

มาเรียม อยู่สุขสวัสดิ์ : บทบาทของกรดแอสคอร์บิกต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของไตในหนูขาวที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโตซิน (ROLE OF L-ASCORBIC ACID IN THE RENAL PATHOPHYSIOLOGY IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS)

อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร; 177 หน้า ISBN 974-17-4754-3

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของกรดแอสคอร์บิกต่อพยาธิสรีรวิทยาของไตในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยสารสเตรปโตโซโตซิน โดยการฉีดสารสเตรปโตโซโตซินเข้าทางหลอดเลือดดำที่หางด้วยขนาด 55 มก./น้ำหนักตัว 1 กก. ในขณะที่หนูกลุ่มควบคุมได้รับการฉีดสารละลายซีโรตีนฟอรัด้วยปริมาตรเท่ากัน ทำการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดหลังการฉีดสาร 2 วัน หนูที่เป็นเบาหวานและมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่า 200 มก./ดล และหนูกลุ่มควบคุมจะถูกฉีดยาเพื่อให้ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 กรัม/น้ำ 1 ลิตร หรือน้ำธรรมดาอย่างเพียงพอเป็นเวลานาน 4, 8, 16 และ 24 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง ตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดและทำการศึกษาศีรษะของอินูลิน และกรดพาราอะมิโนอิพูริค เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของอัตราการกรองของไตและอัตราการไหลของพลาสมาเข้าสู่ไตตามลำดับ ตรวจวัดความดันเลือดแดงตลอดการทดลองและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความต้านทานของหลอดเลือดภายในไต ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนของการกรอง อัตราการไหลของปัสสาวะ สัดส่วนการไหลของปัสสาวะต่ออัตราการกรอง อัตราการขับทิ้งของโซเดียม ไปแอสเซียมและคลอไรด์ไอออน ตลอดจนสัดส่วนของการขับทิ้งอิเล็กโทรไลต์เหล่านี้ สัดส่วนของน้ำหนักไตคือน้ำหนักตัว นอกจากนั้นทำการทดลองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรียของไต ตรวจวิเคราะห์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเนื้อไตส่วนคอร์เทกซ์ ระดับของสารที่จีเอฟเบตา-วันและการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสทรานสปอร์เตอร์-วัน ทำการศึกษาพยาธิวิทยาของไตโดยการย้อมสีพิเศษเพอร์ออกไซด์-ซีฟ และตรวจดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหน่วยไตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการศึกษาพบว่า หนูเบาหวานที่ไม่ได้ให้สารละลายกรดแอสคอร์บิกมีความบกพร่องในการทำงานของไตโดยมีการลดลงของอัตราการกรองและอัตราการไหลของพลาสมาเข้าสู่ไต ความต้านทานของหลอดเลือดในไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) การให้สารละลายกรดแอสคอร์บิกแก่หนูเบาหวานเป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ช่วยให้อัตราการกรองและอัตราการไหลของพลาสมาเข้าสู่ไตเพิ่มขึ้น ความต้านทานของหลอดเลือดในไตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิก นอกจากนั้นหนูเบาหวานที่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้ให้สารละลายกรดแอสคอร์บิกดังนี้ สัดส่วนของการขับทิ้งของโซเดียมและไปแอสเซียมลดลงที่สัปดาห์ที่ 8 และในสัปดาห์ที่ 24 มีการลดลงของอัตราการขับทิ้งของโซเดียม ไปแอสเซียมและระดับความเข้มข้นของโซเดียมในพลาสมา การศึกษานี้ยังพบอีกว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง และมีสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักไตต่อน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่สัปดาห์ที่ 16

ผลการศึกษาการทำงานของไมโทคอนเดรียของไต พบว่า ในสัปดาห์ที่ 24 เมื่อให้กลูตาเมทและมาเลทไมโทคอนเดรีย หนูเบาหวานทั้งสองกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีอัตราการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ทั้งในระยะพักและระยะถูกกระตุ้น และดัชนีชี้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรีย (P/O) ของไตเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม เมื่อให้ซัคซินทูเอไมโทคอนเดรีย พบว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีดัชนีชี้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรียของไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ขณะที่หนูเบาหวานที่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีดัชนีชี้วัดการทำงานของไมโทคอนเดรียของไตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิก

หนูเบาหวานทั้งสองกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีระดับของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเนื้อไตส่วนคอร์เทกซ์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) ที่สัปดาห์ที่ 8 และ 24 ขณะที่สัปดาห์ที่ 16 หนูเบาหวานที่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิก มีระดับของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้ให้สารละลายกรดแอสคอร์บิกและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ระดับของสารที่จีเอฟเบตา-วันในเนื้อไตส่วนคอร์เทกซ์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 ถึง สัปดาห์ที่ 24 การให้สารละลายกรดแอสคอร์บิกแก่หนูเบาหวานช่วยให้ระดับที่จีเอฟเบตา-วันลดลงและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 16 และ 24 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกในสัปดาห์ที่ 16 เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของกลูโคสทรานสปอร์เตอร์-วัน พบว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีระดับของกลูโคสทรานสปอร์เตอร์-วันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิก ขณะที่หนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีระดับของกลูโคสทรานสปอร์เตอร์-วันไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาทางพยาธิสภาพของไต พบว่าหนูเบาหวานทั้งสองกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมีจำนวนหน่วยไตที่ผิดปกติ เกิดไกลเมอรูโลสเคอโรซิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 16 และ 24 การให้สารละลายกรดแอสคอร์บิกช่วยให้จำนวนไกลเมอรูโลสเคอโรซิสลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้ให้สารละลายกรดแอสคอร์บิก

การศึกษานี้สรุปได้ว่า การเสริมกรดแอสคอร์บิกให้แก่หนูเบาหวานสามารถลดความรุนแรงของการเกิดพยาธิสรีรวิทยาของไตได้ กลไกการออกฤทธิ์ของกรดแอสคอร์บิกคือการยับยั้งการสร้างสารที่จีเอฟเบตา-วัน ผ่านการลดระดับของออกซิเดทีฟสเตรสโดยการเพิ่มปริมาณกลูโคสทรานสปอร์เตอร์-วัน ซึ่งคาดว่าเพื่อเพิ่มการผ่านเข้าเซลล์ของกรดแอสคอร์บิก

สาขาวิชา สรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)  
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

# # 4389662620: MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: L-ASCORBIC ACID/ RENAL PATHOPHYSIOLOGY/  
STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

MARIEM YUSUKSAWAD: ROLE OF L-ASCORBIC ACID IN RENAL  
PATHOPHYSIOLOGY IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC  
RATS. THESIS ADVISOR: PROF. NARONGSAK CHAIYABUTR, Ph.D.  
177 pp. ISBN 974-17-4754-3

The present study was performed to investigate whether L-ascorbic acid supplementation is able to ameliorate the renal dysfunction and pathology in streptozotocin-induced diabetic rats. Male Sprague-Dawley rats were randomly induced diabetes mellitus by intravenous injection of streptozotocin (STZ) (55 mg/kg BW) while the control rats were injected with citrate buffer as a placebo. Hyperglycemic stage (blood glucose concentration > 200 mg/dl) was verified two days after the diabetic induction. L-ascorbic acid (AA) 1 g/L in drinking water was given to either a control group (CON-AA) or a diabetic group (STZ-AA) in *ad libitum*. Another control group (CON) or diabetic group (STZ) was given with tap-water. The experimental studies were carried out for 4, 8, 16 and 24 weeks of the administrations. At the end of specified period, blood glucose was measured and renal clearance studies of inulin and para-aminopippuric acid were performed to determine the glomerular filtration rate (GFR) and the effective renal plasma flow (ERPF), respectively. Systemic blood pressure was measured throughout the clearance study. Urine flow rate (V), urinary excretion (UE) of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> and plasma concentration of the electrolytes were determined. Filtration fraction (FF), V/GFR, fractional excretion (FE) of the electrolytes, renal vascular resistance (RVR) and percentage of kidney weight to body weight (KW/BW) were calculated. In addition, mitochondrial activity was studied. The concentrations of malondialdehyde (MDA), transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1) and glucose transporter-1 (Glut 1) expression in renal cortex were determined. A number of abnormal glomeruli (glomerulosclerosis) was examined by the periodic acid-Schiff staining under light microscope for the renal pathological study.

GFR and ERPF of STZ-AA were significantly increased ( $p < 0.05$ ) and RVR was decreased ( $p < 0.05$ ) as compared with STZ at week 16. As compared with STZ, FE of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> were decreased ( $p < 0.05$ ) in STZ-AA at week 8. The significant decreases in UE of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and plasma concentration of Na<sup>+</sup> were seen in STZ-AA at week 24. In addition, the blood glucose concentration and the percentage of KW/BW were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) at week 16.

On the study of renal mitochondrial activity, both STZ and STZ-AA demonstrated the increased oxygen consumption rates in both the resting stage and the stimulated stage ( $p < 0.05$ ) as compared with CON at week 24, using glutamate and malate as the substrates. In the case of using succinate as the substrate, STZ showed the significant increase in the value of P/O ( $p < 0.05$ ) as compared with that of CON. AA could normalize the mitochondrial activity in STZ-AA.

STZ rats showed the increases in the MDA concentration in the renal cortex at week 8 and 24 as compared with that of CON. The MDA concentration of STZ-AA was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) as compared with that of STZ at week 16. The TGF- $\beta$ 1 concentrations in the renal cortex of STZ were significantly increased ( $p < 0.05$ ) as compared with those of CON since week 8 to week 24. STZ-AA showed the significant decrease in the TGF- $\beta$ 1 concentration, which were not different from CON at week 16 and 24. The TGF- $\beta$ 1 concentration of STZ-AA was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) as compared with that of STZ at week 16. In the present study, STZ-AA showed the significant increase ( $p < 0.001$ ) in Glut 1 expression in the renal cortex as compared with that of STZ at week 16, while STZ showed the expression of Glut 1 as same as that of CON.

The renal pathological study demonstrated the significant increases in a number of abnormal glomeruli of STZ as compared with that of CON at week 16 and 24. AA could significant decrease in ( $p < 0.05$ ) the numbers of abnormal glomeruli in STZ-AA as compared with that of STZ at week 16 and 24.

In conclusion, the present study indicates that AA is able to ameliorate the renal pathophysiology in STZ-induced diabetic rats. The mechanism of AA on the renal pathophysiology may be the inhibition of TGF- $\beta$ 1 production via the suppression of oxidative stress by Glut 1 upregulation.

Field of Study... Physiology (Inter-Department)

Academic year..... 2005.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

*Mariem Yusuksawad*  
*Narongsak Chaiyabutr*

## ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude to my dissertation adviser Professor Dr. Narongsak Chaiyabutr for his kindly teaching me the renal function and mitochondrial activity experiments, keenly providing the equipments, helpful suggestions, critical reading the manuscript and his encouragement throughout the study. His helping in writing the manuscript is especially appreciated.

My sincere appreciation would be expressed to Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj for her introducing me to the area of diabetic model and for her kindness to look up the manuscript. I also wish to express my special thanks to Dr. Hideyuki Niimi for his invaluable suggestions.

I wish to express my appreciation to Associate Professor Dr. Prasong Siriviriyakul, Head of Department of Physiology, and Professor Dr. Pirom Kamolrattanakul, Dean of Faculty of Medicine, for their kindly giving me the opportunity to leave for Doctoral study.

I wish to express my great appreciation to Dr. Supang Maneesri le Grand for her accommodation in the part of histopathology in my thesis and to Dr. Wipawee Kittikovit for her counseling in renal pathology.

My great thanks would be expressed to Dr. Sirima Thongruay and Mr. Theerasak Norapaksunthorn for their teaching and kindly assistance in the analyses of TGF- $\beta$ 1 and Glut1 and for their collaboration in the problem discussions during the analyses.

I wish to thank Dr. Onrawee Khongsombat for her helpfully training me the mitochondrial activity experiments.

I would like to thank Associate Professor. Dr. Sukanya Werawatgoompa of Chula MRC for her kindly providing the laboratory facilities.

My thanks would also extend to Miss Kitiya Srisakwattana and Miss Siripen Komolvanich who have kindly given me the chemical discussions and invaluable suggestions. I would like to give special thanks to Miss Pattarin Sridulyakul, for her laboratory suggestions and all of her courtesies.

I would like to thank Mrs. Sukanya Panitnok, Mrs. Preeyanuch Ratchatahirun and Mr. Pathompong Bunpaburuth for all accommodations and cheerfulness.

I wish to acknowledge Ministry of University Affairs (MUA)-CU Thesis Grant for the financial support in conducting this study.

Finally, I would like to express my extremely appreciation to my parents for their love and encouragement. My deepest appreciation would be expressed to my dear husband for sharing his life with me and for his devotion during my long studying.

# TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
TABLE OF CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLES .....	xii
LIST OF FIGURES.....	xv
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xx
CHAPTER	
I    GENERAL INTRODUCTION.....	1
II   BACKGROUND INFORMATIONS.....	4
•  Electron transport and oxidative phosphorylation.....	5
- System components of electron transport chain .....	6
•  Glucose transporter (Glut) .....	8
•  Dehydroascorbate (DHA) transport.....	11
•  Streptozotocin induces type I diabetes mellitus .....	12
•  Mechanisms of diabetic nephropathy development	
1. Hyperglycemia.....	14
1.1 Glucotoxicity.....	14
1.2 Non-enzymatic glycation.....	15
1.3 The polyol pathway .....	15
2. Hypertension.....	17
3. Proteinuria .....	17
•  Diabetic microvascular complications	18
•  Hyperglycemia stimulates the development of diabetic nephropathy.....	20
•  Oxidative stress induces diabetic nephropathy .....	23
•  High glucose milieu induces GLUT <sub>1</sub> and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> overexpression in diabetic glomeruli.....	24
•  Alterations of renal hemodynamics in diabetes mellitus .....	25

	<b>Page</b>
• Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction .....	26
• Evidences of L-ascorbic acid beneficial effect on diabetes mellitus .....	30
• Transportation of dehydroascorbate and glucose via GLUT1.....	31
<b>III MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>33</b>
1. Animal preparation.....	33
2. L-ascorbic acid supplementation.....	34
3. Experimental procedures .....	35
3.1 Determination of the effect of L-ascorbic acid supplementation on renal hemodynamics and functions in STZ-induced diabetic rats.....	35
• Calculation for the measurements of renal hemodynamics and function .....	36
3.2 Determination of the effect of L-ascorbic acid supplementation on renal mitochondrial activity in STZ-induced diabetic rats.....	36
• Preparation of mitochondrial homogenate .....	38
• Chemicals for renal mitochondrial activity .....	38
• Procedure.....	39
• Calculation for the measurements of renal mitochondrial activities .....	38
3.3 Determination of the effect of L-ascorbic acid supplementation on lipid peroxidation in renal cortex of STZ-induced diabetic rats.....	40
• Preparation of renal cortex homogenate .....	40
• Determination of total protein .....	40
- Chemicals for protein content.....	40
- Procedure .....	41



	<b>Page</b>
• Determination of lipid peroxide.....	41
- Chemicals for lipid peroxide.....	41
- Procedure.....	41
3.4 Determination of the effect of L-ascorbic acid supplementation on transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) concentration in renal cortex in STZ-induced diabetic rats .....	42
3.5 Determination of the effect of L-ascorbic acid supplementation on glucose transporter 1(Glut1) protein in renal cortex in STZ-induced diabetic rats .....	43
3.6 Determination of glomerular pathology in STZ-induced diabetic rats with L-ascorbic acid supplementation.....	44
4. Statistical analyses.....	45
IV   ROLE OF L-ASCORBIC ACID IN RENAL HEMODYNAMICS AND FUNCTIONS IN STZ-INDUCED DIABETIC RATS.....	46
• Introduction.....	46
• Materials and methods.....	47
• Statistics.....	47
• Results .....	47
- Effect of L-ascorbic acid supplementation on blood glucose concentration .....	49
- Effect of L-ascorbic acid supplementation on physical alterations.....	51
- Effect of L-ascorbic acid supplementation on general circulation.....	55
- Effect of L-ascorbic acid supplementation on renal hemodynamics and glomerular functions.....	61
- Effect of L-ascorbic acid supplementation on renal tubular functions .....	68

	<b>Page</b>
• Discussion.....	80
V    ROLE OF L-ASCORBIC ACID IN RENAL MITOCHONDRIAL ACTIVITY IN STZ-INDUCED DIABETIC RATS .....	86
• Introduction.....	86
• Materials and methods.....	86
• Statistics.....	87
• Results .....	87
• Discussion.....	95
VI   ROLE OF L-ASCORBIC ACID IN RENAL CORTICAL LIPID PEROXIDATION, TGF- $\beta$ 1 AND GLUT 1 IN STZ-INDUCED DIABETIC RATS.....	97
• Introduction.....	98
• Materials and methods.....	99
• Statistics.....	100
• Results .....	100
- MDA, TGF- $\beta$ 1 concentration and Glut 1 expression .....	100
• Discussion.....	109
VII  PATHOLOGICAL STUDY OF GLOMERULAR PART IN STZ-INDUCED DIABETIC RATS WITH L-ASCORBIC ACID SUPPLEMENTATION .....	113
• Introduction.....	113
• Materials and methods.....	113
• Statistics.....	114
• Results .....	114
• Discussion.....	119

	<b>Page</b>
VIII GENERAL DISCUSSION .....	120
IX. CONCLUSION .....	126
REFERENCES.....	130
APPENDIX.....	153
PUBLICATIONS.....	154
BIOGRAPHY .....	155

## LIST OF TABLES

		<b>Page</b>
<b>Table 1-1</b>	The different types of glucose transporters.....	10
<b>Table 4-1</b>	Comparisons of blood glucose concentrations among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	49
<b>Table 4-2</b>	Comparison of body weight, kidney weight and ratio of kidney weight to body weight among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation. ....	53
<b>Table 4-3</b>	General circulation comparisons among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	57
<b>Table 4-4</b>	Renal hemodynamics comparisons among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	64
<b>Table 4-5</b>	Comparisons of urine flow rate and fractional excretion of urine among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation....	72
<b>Table 4-6</b>	Comparisons of urinary excretion of electrolytes among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	74

<b>Table 4-7</b>	Comparisons of fractional excretion of electrolytes among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	76
<b>Table 4-8</b>	Comparisons of plasma electrolytes among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	78
<b>Table 5-1</b>	Comparisons of renal mitochondrial activity (glutamate and malate as the substrates) among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	89
<b>Table 5-2</b>	Comparisons of renal mitochondrial activity (succinate as the substrates) among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	90
<b>Table 6-1</b>	Malondialdehyde concentration in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 4, 8, 16 and 24 of the experimental period .....	103
<b>Table 6-2</b>	Transforming growth factor- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) concentration in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 4, 8, 16 and 24 of the experimental periods .....	105

**Page**

<b>Table 6-3</b>	Absorbance at 492 nm of Glut 1 in 25 and 40 $\mu$ g of total protein in renal cortex homogenate of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 16 of the experimental periods.....	107
<b>Table 7-1</b>	Changes in the number of abnormal glomeruli of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 4, 8, 16 and 24 of the experimental periods.....	116

## LIST OF FIGURES

		<b>Page</b>
<b>Figure 2-1</b>	The pathway of glycolysis.....	4
<b>Figure 2-2</b>	Electron transport chain.....	5
<b>Figure 2-3</b>	The two dimension of glucose transporter.....	9
<b>Figure 2-4</b>	The three dimension of glucose transporter .....	9
<b>Figure 2-5</b>	Molecular structure of glucose, ascorbic acid and dehydroascorbate.....	11
<b>Figure 2-6</b>	Suggested mechanisms of streptozotocin toxicity on $\beta$ -cell.....	13
<b>Figure 2-7</b>	ROS reduces the biological effects of NO and induces the renalvascular complications.....	18
<b>Figure 2-8</b>	Risk factors of the endothelial dysfunction lead to the coronary artery disease and renal pathophysiology.....	19
<b>Figure 2-9</b>	The relationship of the involved factors in the microvascular damage in diabetes mellitus.....	21
<b>Figure 4-1</b>	Alterations of blood glucose concentrations among groups of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	50
<b>Figure 4-2</b>	Alterations of body weight, kidney weight and percentage of kidney weight to body weight in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	54

<b>Figure 4-3</b>	Alterations of mean arterial pressure (MAP), systolic pressure (SP) and diastolic pressure (DP) in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	59
<b>Figure 4-4</b>	Alterations of pulse pressure (PP), heart rate (HR) and hematocrit (Hct) in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	60
<b>Figure 4-5</b>	Alterations of glomerular filtration rate (GFR), effective renal plasma flow (ERPF) and filtration fraction (FF) in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation. ....	66
<b>Figure 4-6</b>	Alterations of effective renal blood flow (ERBF), renal vascular resistance in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	67
<b>Figure 4-7</b>	Alterations of urine flow rate (V) and percentage of V to GFR in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	73
<b>Figure 4-8</b>	Alterations of urinary excretion of chloride in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....	75



**Page**

- Figure 4-9** Alterations of fractional excretion of sodium in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation.....77
- Figure 4-10** Alterations of plasma sodium (pNa), plasma potassium (PK) and plasma chloride (PCl) in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation..... 79
- Figure 5-1** Alterations of rates of oxygen consumption in stage 4 (resting stage) and stage 3 of renal mitochondrial respiration when glutamate and malate were the substrates in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 8 and 24 of the experimental periods.....91
- Figure 5-2** Alterations of respiratory control index (RCI) and the ratio of amount of ADP to total oxygen consumption during stage 3 of renal mitochondrial respiration when glutamate and malate were the substrates in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 8 and 24 of the experimental periods..... 92
- Figure 5-3** Alterations of rates of oxygen consumption in stage 4 (resting stage) and stage 3 of renal mitochondrial respiration when succinate was the substrate in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 8 and 24 of the experimental periods..... 93

- Figure 5-4** Alterations of respiratory control index (RCI) and the ratio of amount of ADP to total oxygen consumption during stage 3 of renal mitochondrial respiration when succinate was the substrate in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 8 and 24 of the experimental periods..... 94
- Figure 6-1** Alterations of MDA concentrations in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 4, 8, 16 and 24 of the experimental periods..... 104
- Figure 6-2** Alterations of renal cortical transforming growth factor - $\beta$ 1 concentrations of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 4, 8, 16 and 24 of the experimental periods. .... 106
- Figure 6-3** Absorbances of Glut1 at 492 nm, comparisons of OD of renal cortical Glut 1 concentrations of streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 16 when the samples were 25 and 40 mg. of total protein..... 108
- Figure 7-1** Glomerular pathology of streptozotocin-induced diabetic rats, comparing with normal glomeruli..... 117
- Figure 7-2** Alterations of the numbers of abnormal glomeruli in streptozotocin-induced diabetic rats and control rats with or without L-ascorbic acid supplementation at week 8 and 24 of the experimental periods..... 118

**Page**

<b>Figure 9-1</b>	A scheme represents the effects of supplemental L-ascorbic acid on the renal pathophysiology in the chronic STZ-induced diabetic rats.....	12
<b>Figure 9-2</b>	A scheme represents the proposed mechanisms of L-ascorbic acid effects on the chronic STZ-induced diabetic rats.....	129

## LIST OF ABBREVIATIONS

AA	= L-ascorbic acid
AGEs	= advanced glycation end-products
ADP	= adenosine diphosphate
ANOVA	= analysis of variance
ATP	= adenosine triphosphate
CAD	= coronary artery disease
CoQ	= ubiquinone
$C_{PAH}$	= clearance of PAH
DAG	= diacylglycerol
DCVC	= dichlorovinyl-L-cysteine
DHA	= dehydroascorbate
DMC	= diabetic microvascular complications
DNA	= deoxyribonucleic acid
DP	= diastolic pressure
EGTA	= ethelene glycol –bis (2-aminoethylether)– tetraacetic acid
ELISA	= enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	= endothelial nitric oxide synthase
ERBF	= effective renal blood flow
ERBF	= effective renal blood flow
ERPF	= effective renal plasma flow
FAD	= flavin adenosine dinucleotide
$FADH_2$	= reduced flavin adenosine dinucleotide
FE	= fractional excretion of electrolytes
$FE_{Cl}$	= fractional excretion of chloride
$FE_K$	= fractional excretion of potassium
$FE_{Na}$	= fractional excretion of sodium
FF	= filtration fraction
GLUT-1	= glucose transporter-1
GSH	= reduced glutathione

GSSG	= oxidized glutathione
HbA1c	= hemoglobin A1c
Hct	= hematocrit
HR	= heart rate
IGF	= insulin-like growth factor
LDL	= low density lipoprotein
LSD	= Least significant difference
MAP	= mean arterial pressure
MDA	= malondialdehyde
MN	= mononuclear
NAD <sup>+</sup>	= nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	= reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NE	= norepinephrine
NO	= nitric oxide
OD	= optical density
OONO <sup>-</sup>	= peroxy nitrite radical
OPD	= o-phenylenediamine dihydrochloride
P/O	= ratio of amount of ADP to atom of oxygen
p38 MAPK	= p38 mitogen-activated protein kinase
PAI-1	= plasminogen activator inhibitor
PAS	= periodic acid-Schiff staining
PBS	= phosphate buffer
PBST	= PBS with 0.5% Tween 20
PDGF	= platelet-derived growth factor
P <sub>E</sub>	= concentration of plasma electrolytes
P <sub>gc</sub>	= glomerular capillary pressure
PGI	= prostacyclin
PKC	= protein kinase C
PMN	= polymorphonuclear
PP	= pulse pressure
P <sub>PAH</sub>	= plasma PAH concentration
RAGE	= receptor for advanced glycosylation
RCI	= respiration control index

ROs	= reactive oxygen species
RPTC	= renal proximal tubular cells
RT-PCR	= reverse transcription polymerase chain reaction
RVR	= renal vascular resistance
SDS	= sodium dodecyl sulfate
SNGFR	= single-nephron GFR
SP	= systolic pressure
STZ	= streptozotocin
TBA	= 2-thiobarbituric acid
TCA cycle	= tricarboxylic acid cycle
TGF- $\beta$ 1	= transforming growth factor- $\beta$ 1
TMP	= 1,1,3,3 tetramethoxypropane
TX A2	= thromboxane A2
$U_E$	= concentration of urinary electrolytes
$UV_{Cl}$	= urinary excretion of chloride
$UV_K$	= urinary excretion of potassium
$UV_{Na}$	= urinary excretion of sodium
V	= urine flow rate
V/GFR	= fractional excretion of urine
$V_{O_2}$	= oxygen consumption
VSMC	= vascular smooth muscle cell