ผลของอะครีโนเมดูลลินต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

นางสุภัทรา อมาตยกุล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรคุษฎีบัณฑิต สหสาขาวิชาสรีรวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-835-7

ถิงสิทชิ้งองจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF ADRENOMEDULLIN ON **CARDIOVASCULAR SYSTEM**

MRS. SUPATHRA AMATYAKUL

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology Inter-department of Physiology Graduate School Chulalongkorn University Academic Year 1999

ISBN 974-333-835-7

Thesis Title	EFFECTS OF ADRENOMEDULLIN ON CARDIOVASCULAR SYSTEM
By Inter – department Thesis Advisor Thesis Co-advisor	Mrs. Supathra Amatyakul Physiology Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj, Ph.D. Dr. Hideyuki Niimi, Ph.D.
-	y the Graduate School, Chulalongkorn University in equirement for the Doctor of Philosophy's Degree
_	Dean of Graduate School
	(Professor Dr. Suchada Kiranandana, Ph.D.)
THESIS COMMITTI	EE / E
	Chairman
	(Associate Professor Dr. Prasong Siriviriyakul, M.D.)
	Littul Plan. Thesis Advisor
	(Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj, Ph.D.)
	Thesis Co-advisor
	(Dr. Hideyuki Niimi, Ph.D.)
61 1	Wasan Udayachalen_
ลุฬาลงส	Assistant Professor Dr. Wasan Udayachalerm, M.D.)
_	Just J. Member
(Assista	nt Professor Dr. Jonggonnee Wattnapermpool, Ph.D.)

สุภัทรา อมาดอกุล : ผลของอะครีในเมลูลลินต่อระบบหัวใชเละหลอดเลือด (Effect of Adrenomedullin on Cardiovascular System) อาจารอ์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รส. คร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, อาจารอ์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : Dr. Hideyuki Niimi : 140 หน้า ISBN 974-333-835-7

อะครีไนเมลูอถินเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมีใน 52 ตัว บทบาทของอะคริไนเมลูออินที่ทำให้เกิดภาระความคัน โอพิตด้ำและการขอายด้วของหลอดเลือด เป็นที่สึกษากันมาก อย่างไรก็ตามกลไกของอะคริไนเมลูออินที่ทำให้เกิดผลดังกล่าวอังเป็น ที่สึกษากันอยู่ การทดอองนี้ได้สึกษาถึงบทบาทของสารดังกล่าวต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด และกลไกที่ทำให้เกิดการขอายดัว ของหลอดเลือดได้ไรนารีย์ เราใช้ในเดล 3 แบบในการสึกษาครั้งนี้

การศึกษาทำในหนูแรกเทศผู้พันธุ์วิสดาร์ น้ำหนัก 200-300 กรับ ใน whole body model การให้อะครี ในเมลูลลิน ขนาด 1 นาไม่ในเทกก. เจ้าทางหลอดเลือดคำ พบว่าทำให้ค่าเลลื่อความสันเลือดลดงอย่างรวดเรือภายใน 30 วินาที (29.86±3.31 มม. ปรอก , p<0.001) และกลับสู่ค่าปกติใน 30 บาที โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ การะความตันไลหิดค่าที่ เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากการขยายด้วของระบบหลอดเลือดส่วนปลาย จากข้อสันนิษฐามดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาผลของอะครี ในเมลูลลิน ต่อระบบหลอดเลือดจุดภาคของผิวหนังที่หลังหนูแรก โดยใช้ dormal skimbold chamber model หนว่าเมื่อให้อะครี ในเมลูลลิน ขนาด 10 1 ในอาร์แบบ topical application จะทำให้เกิดการขยายด้วของระบบหลอดเลือดดังกล่าว (เส็นผ่าสูนอีกลางของหลอดเลือด เพิ่มขึ้นจาก 56.80±2.08 ในโครแลรเป็น 59.60 ±2.80 ในโครแลร และจาก 35.00±3.83 ในโครแลรเป็น 40.40±5.49 ในโครแลว ใน second – order และ duird – order arteriole ตามสำลับ , p < 0.05) ผลการทดลองแสดงให้เห็นฉึงผลของอะครี ในเมลูลลินที่ทำให้ เกิดการขยายด้วของระบบหลอดเลือดส่วนปลาย

การศึกษาผลของอะครี ในเมลูสลินต่อการทำงานของหัวใจและต่อระบบหลอดเลือดโดโรนารีซ์ รวมทั้งการศึกษากลไกใน การทำให้พลอดเลือดโคโรนารีอัจอาอดัวทำใน isolated perfused not heart model โดยพบว่าเมื่อให้อะครีโนเมลูลลิน 20 ไมโครกรับ เข้าสู่หัวใจจะทำให้การหคตัว (+ 4p/dt__) และคลายตัว (- 4p/dt__) ของหัวใจลดลง (+ 4p/dt__ ลดลงจาก 1740土78 มม.ปรอท/วินาที เป็น 1678±89 มม.ปรอก/วินาที , p<0.05; - ๗/๕_ กดกงจาก 941±55 มม.ปรอก/วินาที เป็น 897±62 มม.ปรอก/วินาที , p<0.05) ขณะที่อัศราการเด็นของหัวใจ เพิ่มขึ้นจาก 278±6 ครั้งนาที เป็น 305±9 ครั้งนาที , p<0.01 และอัศราการไหลของเลือดผ่านระบบ หลอดเลือดโคโรนารีฮ์ (CBF) เพิ่มขึ้นจาก 7.00±0.27 มล./นาที เป็น 8.32±0.29 มล./นาที , p<0.001 ไม่พบว่าอะครีในเมลูลลินมีผล ค่อการเปลี่ยนแปลงของกลิ้นให่ฟ้าหัวใจพรือการสร้าง cyclic AMP ในหัวใจห้องอ่างข้าย หลังจากทำลายเอ็นได้มีเลียมโดยใช้ Triton X-100 พบว่าผลของอะครีโนเมลูลถินค่อการทำให้หลอดเลือดโดโรนารีอังอาอดัวนั้นมีค่าลดลง (CBF เพิ่มขึ้น 15,70±0,91% ในกลุ่ม ที่ไม่มีการทำลายเป็นโครีเลียม และเพิ่มขึ้นเพียง 4.64±1.50% ในกลุ่มที่มีการทำลายเป็นโคริเลียม 🗩 🗘 001) นอกจากนี้พบว่า L-NNA ซึ่งเป็นตัวขับขั้งการสร้าง nitric oxide และ glibenclamide ซึ่งเป็นตัวขับขั้งการเปิดของ K_{arr} channels ทำให้ผลการขอาช หลอดเลือดใสโรนารีอ์ของอะครีในเมลูลลินลดลง (CBF เพิ่มขึ้น 18.93±1.42% ในกลุ่มที่ได้รับอะครีในเมลูลลินเพื่องออ่างเดือว ใดยเพิ่มขึ้นเพียง 14,90±1,22% ในกลุ่มที่ได้รับอะตรี ในเมลูลลินร่วมกับ L-NNA, p<0,05 และ เพิ่มขึ้นเพียง 5,46±0,67% ในกลุ่มที่ ใต้รับอะตรีในเมลูลลินร่วมกับ glibenclamide, p<0.001 โดย indomethacin ซึ่งเป็นตัวขับขั้งการสร้าง prostaglandin ไม่มีผลดังกล่าว ผลการ พลลองนี้อาจทำให้สรุปได้ว่าอะครี ในเมลูลลินทำให้เกิดการของตัวของหลอดเลือดไดโรนารีอ์โดยมีกลใกหลักที่ผ่านเอ็นโด ชีเดียม ซึ่งพบว่าการหลั่งของ mitric oxide จากเอ็นโคธีเลียม และการกระคุ้น K_{arr} channels ที่เอ็นโครีเลียมและที่กล้ามเนื้อเรียบของ หลอดเลือดมีบทบาทสำคัญ

ภาควิชาท์จัววิทยา	อายมือชื่อนิสิต กันกั อิฮากุจ
สาขาวิชา <u>พราพาจาจิชาพรีฐวิทยา</u>	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษารู้หรือของ ว่าเลาสาร์
ปีการศึกษา 2543	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##C845842: MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: ADRENOMEDULLIN, CARDIOVASCULAR SYSTEM, ISOLATED PERFUSED HEART

SUPATHRA AMATYAKUL: EFFECTS OF ADRENOMEDULLIN ON CARDIOVASCULAR SYSTEM. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: Dr.HIDEYUKI NIIMI, Ph.D. 140 pp. ISBN 974-333-835-7

Adrenomedullin (AM) is a 52 amino acid peptide that was originally discovered in pheochromocytoma tissue. The role of AM as a hypotensive peptide and a potent vasodilator has been reported. However, the nature of the mechanism through which AM exerts its vasoactive property is going on the investigattion. The present study was conducted to approach the physiological relevance of AM especially on the cardiovascular system and to clarify the possibility of mechanism that involve to the effect of AM on coronary vasodilation. The three different experimental models were used in this study.

The study was performed in male Wistar rat weighing 200-300 g. In the whole body model, the intravenous administration of AM (1nmol/kg BW) produced a transient decrease in mean arterial pressure (MAP). This reduction was rapid in onset and reached its peak within 30 seconds (MAP decreased by 29.86 ±3.31mmHg, p<0.001) and returned to its basal level within half an hour. However there was no change in heart rate. Peripheral vasodilation was suggested to involve in this hypotensive effect of AM. Therefore, the dorsal skinfold chamber model was used in order to make further evaluation of the effect of AM on peripheral circulation. Topical application of AM (10⁻⁷ M) on the skin microcirculation produced significant arteriolar dilation at 3 minute after the application (From 56.80±2.08 μm to 59.60±2.80 μm and 35.00±3.83 μm to 40.40±5.49 μm for the second-order and the third-order arteriole, respectively; p<0.05). The result revealed the peripheral vasodilatory effect of AM.

Finally, the main protocol of isolated perfused rat heart model was used in order to assess the biological responses of both cardiac performance and coronary circulation to AM. In addition, the possible mechanism(s) of AM on coronary vasodilation was also employed in this model. When a bolus dose of AM (20 μg) was injected into the heart via an aortic camulation, cardiac contraction (+dp/dt_{max}) and cardiac relaxation (-dp/dt_{max}) decreased (+dp/dt_{max}: from 1740±78 mmHg/sec to 1678±89 mmHg/sec, p<0.05; -dp/dt_{max}: from 941±55 mmHg/sec to 897±62 mmHg/sec, p<0.05) at 5 minute after the administration of AM. Whereas heart rate (HR) and coronary blood flow (CBF) increased (HR: from 278±6 beats/min to 305±9 beats/min at 5 min after AM injection, p<0.01; CBF: from 7.00±0.27 ml/min to 8.32±0.29 ml/min at 3 min after AM injection, p<0.001). Electrocardiogram and ventricular cAMP production of the isolated perfused rat heart was not affected by a bolus injection of AM.

The coronary vasodilation was attenuated after endothelium degradation by Triton X-100 (CBF increased by 15.70±0.91% in endothelium-intact, by 4.64±1.50% in endothelium-damage, p<0.001). Continuous infusion of L-NNA, nitric oxide synthase inhibitor, glibenclamide, an inhibitor of KATP channels; but not indomethacin, an inhibitor of cyclooxygenase pathway, attenuated the coronary vasodilator response to AM (CBF increased by 18.93±1.42% in AM alone group, by 14.90±1.22% in AM+L-NNA group, p<0.05 and by 5.46±0.67% in AM+glibenclamide group, p<0.001). It is concluded that the coronary vasodilator response to AM is major mediated through the endothelium-dependent pathway. For which the mechanisms were expressed through the release of nitric oxide from the endothelium and the activation of KATP channels on endothelium and vascular smooth muscle.

ภาควิชา างจัรวิทเก	oronodon Supathra Amatyakul.
สาขาริชา: พิพพาสาจิสาพ์สสจิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
	อายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม <i>ไม่ วิ</i>

ACKNOWLEDGEMENTS



I would like to express my deepest appreciation to my advisors, Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj and Dr. Hideyuki Niimi for their kind suggestion, thoughtful advice, helpful guidance and constant encouragement through this thesis.

I wish to express my deep gratitude to Assistant Professor Dr. Chookiat Sukunthapree and Associate Professor Dr. Jeerasak Nopakun. My deepest thanks also go to all of the staff of the Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for their kind support and encouragement to complete this study.

I am indebted to all of the teaching staff of the Inter-Department of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University for giving me the knowledge in Physiology which have enable me to a successful study.

I am also very grateful to the members of the thesis committee for their valuable suggestion and correction on my work.

My sincere appreciation is expressed to Professor Piyaratana Tosukhowong, Associate Professor Dr. Anan Srikiatkhachorn MD., Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Associate Professor Dr. Somporn Swasdison for their kind advice and assistance.

My special thank is given to Miss Malee Guay for her help in some biochemical technique and for her friendship. My thank also go to Mrs. Mariem Yusuksawad for her assistance and cheerfulness throughout my study.

I would like to thank the committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents and my greatest appreciation is extended to my family for their wonderful love, understanding, and encouragement throughout my long period study.

CONTENTS

THAI ABSTRACTiv ENGLISH ABSTRACTv ACKNOWLEDGEMENTSvi CONTENTSvii
ACKNOWLEDGEMENTSvii
CONTENTSvii
CONTENTSvii
LIST OF TABLESviii
LIST OF FIGURESx
ABBREVIATIONSxiii
CHAPTER
I. INTRODUCTION1
II. MATERIALS AND METHODS44
III. RESULTS60
IV. DISCUSSION95
V. CONCLUSION113
REFERENCES115
APPENDIX134
PUBLICATIONS139
BIOGRAPHY140
ลถาบนวทยบรการ

LIST OF TABLES

TA	BLE	PAGE
3.1	The effect of intravenous injection of adrenomedullin	62
	(1 nmol/kg BW) on mean arterial blood pressure	.02
3.2	The effect of intravenous injection of adrenomedullin	
	(1 nmol/kg BW) on heart rate	.62
3.3	The effect of topical application of adrenimedullin	
	(10 ⁻⁷ M) on arteriolar diameter of rat skin microcirculation	.64
3.4	The percent change from baseline diameter of rat skin	
	microcirculation after topical application of	
	adrenomedullin (10 ⁻⁷ M)	.65
3.5	The effect of bolus injection of adrenomedullin (20 μg)	
	on cardiac performance in isolated perfused rat heart	.70
3.6	The percent change from baseline values of cardiac	
	parameter after the bolus injection of adrenomedullin	
	(20 μg) in isolated perfused rat heart	71
37	The effect of bolus injection of normal saline solution	
	on cardiac performance in isolated perfused rat heart	.77
3.8	The effect of bolus injection of adrenomedullin (20 µg)	
	on ventricular cAMP accumulation in isolated perfused	
	rat heart	78
3.9	The effect of treatment with Triton X-100 on coronary	
	response to bradykinin and sodium nitroprusside in	
	isolated perfused arrested rat heart	81

3.10	The percent change from baseline value of coronary blood flow following bolus injection of bradykin (0.1 µg)	
	in endothelium-intact and endothelium-damaged	
	coronary arteries and following bolus injection of sodium	
	nitroprusside (15 µg) in endothelium-damaged coronary	00
	arteries of isolated perfused rat heart	82
3.11	The effect of treatment with Triton X-100 on coronary	
	response to adrenomedullin (20 µg) in isolated perfused	
	arrested rat heart	84
3.12	The percent change from baseline value of coronary	
	blood flow following bolus injection of adrenomedullin	
	(20 µg) in endothelium-intact and endothelium-damaged	
	coronary arteries of isolated perfused arrested rat heart	85
3.13	Changes in coronary blood flow produced by continuous	
	infusion of indomethacin, N ^G -nitro-L-arginine, and	
	glibenclamide in isolated perfused rat heart	88
3.14	Changes in coronary blood flow following bolus injection	
	of adrenomedullin (20 µg) alone and during the	
	pharmacological blockade in isolated perfused rat heart	89
3.15	Changes in coronary blood flow of 3 minute following	
	bolus injection of adrenomedullin (20 µg) alone and	
	during the pharmacological blockade in isolated perfused	
	rat heart	90
	สถางโดเกิดเดเรื่อกร	
	ลถาบนวทยบรการ	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1.1 Cyclic 3',5'- adenosine monophosphate mechanism	16
1.2 Endothelium-derived relaxation	22
1.3 Endothelium-derived contraction	23
1.4 Prostaglandin synthesis in the vascular wall	27
1.5 Endothelium-derived synthesis of nitric oxide	30
1.6 Schematic diagram shows three major mechanisms of vasodilatation involving activation of K_{ATP} channels.	35
1.7 Schematic diagrams show possible functions of potassium channels in endothelium and smooth muscle.	38
2.1 Dorsal skinfold chamber preparation	49
2.2 Dorsal skinfold chamber model with intravital fluoresce microscopy and schematic of arteriole shows the reference point A and the defined point B and C	nce
2.3 The screen of the computer set displaying signals of the cardiac parameters during the experiment	
2.4 The experimental set-up and block diagram of the measuring devices used on the isolated perfused rat hear according to LANGENDORFF	
3.1 Time course of mean blood pressure following intravenous administration of adrenomedullin (1 nmol/kg BW)	
3.2 Percent changes of arteriolar diameter with time after topical application of adrenomedullin at 10 ⁻⁷ M on rat sl microcirculation	•

0	f the second and the third-order arterioles recorded from ne experiment
fe	ime course of maximum rate of cardiac contraction ollowing bolus injection of adrenomedullin (20 µg) in solated perfused rat heart
	Time course of maximum rate of cardiac relaxation following bolus injection of adrenomedullin in isolated perfused rat heart
	Time course of heart rate following bolus injection of adrenomedullin (20 µg) in isolated perfused rat heart
3.7	Time course of coronary blood flow following bolus injection of adrenomedullin (20 µg) in isolated perfused rat heart
3.8	The example of electrocardiogram recorded from one experiment of the isolated perfusedrat heart before and after bolus injection of adrenomedullin (20 µg)
3.9	Comparison of percentage changes in coronary blood flow following bolus injection of bradykinin (0.1µg) in endothelium-intact and endothelium-damaged coronary arteries and following bolus injection of sodium nitroprusside
	(15µg) in endothelium-damaged coronary arteries of isolated perfused arrested rat heart
3.10	The effect of indomethacin on adrenomedullin-induced increase in coronary blood flow of isolated perfused rat heart
3.11	The effect of N ^G -nitro-L-arginine on adrenomedullin-induced increase in coronary blood flow of isolated perfused rat heart

3.12	The effect of glibenclamide on adrenomedullin-induced increase in coronary blood flow of isolated perfused rat heart	3
3.13	Comparison of percent changes in coronary blood flow following bolus injection of adrenomedullin alone, or during continuous infusion of indomethacin,	
	N ^G -nitro-L-arginine, and glibenclamide in isolated perfused rat hearts9	4
4.1	The proposed mechanism of adrenomedullin-induced coronary vasodilation in isolated perfused rat heart model	05
4.2	Schematic diagram shows three major mechanisms of endothelium-derived vasodilation	07

พาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

 A_2 = The second - order arteriole

 A_3 = The third - order arteriole

AM = Adrenomedullin

ANP = Atrial natriuretic peptide

ATP = Adenosine triphosphate

BK = Bradykinin

BW = Body weight

°C = Degree celcius

 Ca^{2+} = Calcium ion

 $[Ca^{2+}]_i$ = Intracellular calcium concentration

CaCl₂ = Calcium chloride

cAMP = Cyclic adenosine monophosphate

CBF = Coronary blood flow

cGMP = Cyclic guanosine monophosphate

CGRP = Calcitonin gene - related peptide

 $C_6H_{12}O_6$ = Glucose

 CO_2 = Carbon dioxide

DMSO = Dimethyl sulfoxide

 $+dP/dt_{max}$ = Maximal positive derivative

 $-dP/dt_{max}$ = Maximum negative derivative

EDHF = Endothelium - derived hyperpolarizing factor

EDRF = Endothelium - derived relaxing factor

EKG = Electrocardiogram

eNOS = Endothelium nitric oxide synthase

ET = Endothelium

g = Gram

Glib = Glibenclamide

hr = Hour

HR = Heart rate

 I_{Ca} = Calcium current

Indo = Indomethacin

ip = Intraperitoneal

iv = Intravenous

K⁺ = Potassium ion

 K_{ATP} channels = ATP - sensitive potassium channels

KCl = Potassium chloride

kg = Kilogram

KH₂PO₄ = Potassium dihydrogen phosphate

L-NNA = N^G - Nitro - L - arginine

M = Molar

MAP = Mean arterial pressure

mg = Milligram

MgSO₄ = Magnesium sulphate

min = Minute

ml = Millilitre

mm = Millimeter

mmHg = Millimeter mercury

NaCl = Sodium chloride

NaHCO₃ = Sodium bicarbonate

nm = Nanometer

nmol = Nanomol

NO = Nitric oxide

NOS = Nitric oxide synthase

 O_2 = Oxygen

pmol = Picomol

PP = Perfusion pressure

 $Q = (-dP/dt_{max}) / (+dP/dt_{max})$

sec = Second

SNP = Sodium nitroprusside

vol = Volume

VSMC = Vascular smooth muscle cell

wt = Weight

μg = Microgram

μm = Micrometer

μM = Micromolar