

การตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์มิโทไครต์ในกระแสเลือด
ในหนูแรทที่มีภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว: บทบาทของระบบแองจิโอเทนซิน

นางสาว จันทร์เพ็ญ อุดม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสารีรวิทยา สหสาขาวิชาสารีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1141-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20652896

APOPTOSIS OF CIRCULATING LYMPHOCYTE IN
UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTIVE RAT:
ROLE OF ANGIOTENSIN SYSTEM

Miss Janpen Udom

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Physiology
Inter-department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic year 2002
ISBN 974-17-1141-7

จันทร์เพ็ญ อุดม : การตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ลิมโฟไซตในกระแสเลือดในหนูแรทที่มีภาวะ
 อุดกั้นท่อไตข้างเดียว : บทบาทของระบบแองจิโอเทนซิน (apoptosis of circulating lymphocyte in
 unilateral ureteral obstructive rat: role of angiotensin system) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สมจิตร์
 เอี่ยมอ่อง, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. พญ. ธาดา สืบหลินวงศ์ 112 หน้า ISBN 974-17-1141-7.

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ลิมโฟไซตในกระแสเลือดในหนูแรทที่มีภาวะอุดกั้นท่อไต
 ข้างเดียว รวมทั้งศึกษาบทบาทของระบบแองจิโอเทนซินต่อการตายของเซลล์ลิมโฟไซตในภาวะดังกล่าว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น
 2 การศึกษาใหญ่ ๆ คือ การศึกษาที่ 1 ซึ่งทำการทดลองในหนูแรทพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 220 ถึง 250 กรัม ที่ชักนำให้เกิดภาวะอุดกั้น
 ท่อไตข้างเดียวเป็นระยะเวลา 1 วัน ถึง 7 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจวัดระดับจำนวนลิมโฟไซต
 ในกระแสเลือดและหาเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์โดยย้อมด้วย 0.4 % trypan blue ในการศึกษาที่ 2 จะแบ่งการทดลองออกเป็น
 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่ม sham (ระยะเวลา 1 วัน และ 7 วัน) และกลุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว (ระยะเวลา 1 วัน
 และ 7 วัน) ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มการทดลองนี้ยังแบ่งออกเป็นอีก 3 กลุ่มย่อย คือ 1) ได้รับน้ำดื่มเพียงอย่างเดียว 2) ได้รับน้ำดื่มผสม
 angiotensin II receptor antagonist (ARA, losartan: 10 mg/kg/d) และ 3) ได้รับน้ำดื่มผสม angiotensin converting enzyme
 inhibitor (ACEI, enalapril: 5 mg/kg/d) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดตรวจวัดระดับจำนวนลิมโฟไซต หาเปอร์เซ็นต์
 การตายของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ลิมโฟไซต โดยใช้วิธี *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT
 assay) ซึ่งสามารถตรวจนับเซลล์ดังกล่าว โดยใช้กล้อง fluorescence microscope ผลการทดลอง จากการการศึกษาที่ 1 พบว่าในกลุ่ม
 ที่มีภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว มีระดับของซีรั่มครีเอตินินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เฉพาะ
 ในวันที่ 1, 4 และ 7 ในขณะที่จำนวนลิมโฟไซตในกระแสเลือด มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในวันที่ 4 ($p < 0.05$) เท่านั้น
 ซึ่งหลังจากนั้นจำนวนลิมโฟไซตจะมีระดับเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมี
 นัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 1 และ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองของการศึกษาที่ 2 พบว่าในกลุ่มที่มีภาวะอุดกั้น
 ท่อไตข้างเดียวเป็นระยะเวลา 1 วัน ที่ได้รับทั้ง ACEI และ ARA มีค่าระดับของซีรั่มครีเอตินินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลุ่ม
 การทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน มีเฉพาะกลุ่มที่ได้รับ ACEI เท่านั้น ที่ระดับของซีรั่มครีเอตินินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อ
 เปรียบเทียบกับกลุ่ม sham 1 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ กลุ่มที่มีภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียวเป็นระยะเวลา 1 วัน ที่ได้รับ ARA มีค่า
 ระดับจำนวนลิมโฟไซตในกระแสเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham ($p < 0.05$) หรือเปรียบเทียบกับกลุ่ม
 ที่ได้รับน้ำเพียงอย่างเดียว ($p < 0.001$) ในขณะที่ระดับดังกล่าวนี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่ม 7 วัน พบว่า ACEI สามารถลดเปอร์เซ็นต์
 การตายของเซลล์ลิมโฟไซตอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกลุ่มที่มีภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว ทั้ง 1 วันและ 7 วัน เมื่อ เปรียบเทียบ
 กับกลุ่ม sham ที่ได้รับ ACEI ในขณะที่ ARA ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ดังกล่าว ภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียวเป็นระยะ
 เวลา 1 วันและ 7 วัน สามารถเพิ่มการเกิดอะพอพโทสิสของเซลล์ลิมโฟไซตอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม
 sham แต่การตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ที่มีค่าสูงดังกล่าวนี้ จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้ ACEI ($P < 0.001$) หรือ
 ให้ ARA ($p < 0.001$) ซึ่งผลการทดลองนี้เกิดขึ้นเฉพาะในกลุ่มที่เป็นระยะเวลา 7 วันเท่านั้น

จากการศึกษานี้ ได้แสดงข้อมูลเป็นครั้งแรกที่เกี่ยวข้องกับภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียวว่า ระบบแองจิโอเทนซินมีบทบาท
 สำคัญของการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ลิมโฟไซตในกระแสเลือด เมื่อยับยั้งการทำงานของระบบดังกล่าวสามารถป้องกันการ
 การตายแบบอะพอพโทสิสที่เพิ่มขึ้นนั้นได้ ซึ่งอาจมีผลช่วยฟื้นฟูและส่งเสริมกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายขณะที่มี
 ภาวะอุดกั้นท่อไตข้างเดียว

หลักสูตร... สาขาวิชาสัตววิทยาลายมือชื่อนิสิต..... Dr. O
 สาขาวิชา... สัตววิทยาลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... N. Sombod
 ปีการศึกษา... 2545ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... Dr. Sombod

4389057020: MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTIVE RAT/ CIRCULATING LYMPHOCYTE APOPTOSIS/ ANGIOTENSIN SYSTEM
JANPEN UDOM : APOPTOSIS OF CIRCULATING LYMPHOCYTE IN UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTIVE RAT : ROLE OF ANGIOTENSIN SYSTEM. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF : SOMCHIT EIAM-ONG, PH.D. , THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. TADA SUEBLINGVONG, M.D. 112 pp ISBN 974-17-1141-7

This research studied apoptosis of circulating lymphocyte in unilateral ureteral obstructive (UUO) rats as well as the role of angiotensin system. The experiments were conducted in two main studies. In study I, male Wistar rats weighted 220-250 g. were induced to be UUO at different periods (1 day to 7 days). The levels of circulating lymphocyte were measured and the percentage of cell death was examined by trypan blue dye exclusion assay. In study II, the animals were divided into two main groups: sham operation (S) and UUO. Each group of these, then was further divided into three subgroups of treatment: 1) only water, 2) water + angiotensin II receptor antagonist (ARA, losartan: 10 mg/kg/d), and 3) water + angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI, enalapril: 5 mg/kg/d). The treatment was performed for either 1 day or 7 days. Besides the measurement of number of circulating lymphocyte and percentage of cell death, the apoptosis of the cell was detected as well by *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT assay). The apoptotic markers were counted under fluorescence microscope. The results, from study I, showed that the levels of serum creatinine in rats with UUO was significant increased only on day 1, 4 and 7 as compared with the control group (p<0.05). The number of circulating lymphocyte significantly decreased especially on day 4 (p<0.05) and then restored back, whereas the percentage of cell death reached a significant rise on day 1 and 4 (p<0.05) as compared with control. In study II, the data demonstrated that all 1-day UUO animals had significant increases in serum creatinine while the 7-day UUO rats showed a higher level only in ACEI treated group (p<0.05) as compared to their respective S groups. The ARA treatment in 1-day UUO rats caused a decrease in circulating lymphocyte level when compared with S (p<0.05) as well as with UUO + water group (p<0.001). This circulating level did not alter in 7-day UUO group. The ACEI, but not ARA, could attenuate the percentage of cell death in both 1-day and 7-day UUO animals (p<0.05). When compared with the respective S groups, UUO at both 1 day and 7 days markedly induced increases in lymphocyte apoptosis expressed as apoptotic index (p<0.001). ACEI as well as ARA could reduce the heightened apoptotic index at 7-day period of UUO (p<0.001 and p< 0.01, respectively), but had no effects in 1-day UUO animals.

Thus, the present data are the first evidence that, during UUO, the angiotensin system plays a pivotal role in circulating lymphocyte apoptosis. The longer blockage of this system could abolish the induction of apoptotic lymphocyte cell. This may result in improvement of immune defense mechanism during unilateral ureteral obstruction.

Department Inter-department Physiology Student's signature..... Janpen Udom.....
Field of study..... Physiology..... Advisor's signature..... S. Eiam-Ong.....
Academic year..... 2002..... Co-advisor's signature..... Tada Sueblingvong.....



ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis was carried out successfully through many valuable advices, 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 Tada Sueblinvong, M.D., Department of Biochemistry, whom I would like to express my deep gratitude.

I would like to express my sincere thanks to Department of Physiology and Department of Biochemistry Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for provision facilities and to Nephrology Laboratory, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for analysis of blood chemistry. The thanks also are expressed to The Andrology Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for the permission to use the Fluorescence microscope.

I wish to express my sincere thanks to all teachers and friends at Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University who are not mentioned here for all their loving helps during the time I was studying. My special thanks are expressed to Mr.Surawut Lertwanawatana, Miss Tipsuda Plumchai, Miss Yuyen Seujange, and Miss Jintana Tanyong for their helps in this study.

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

I would like to thank the Ratchadapiseksompoth Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Last but not least, I would like to give my whole hearted love and gratitude to my parents, sisters and brothers for their kindness and endless supports given to me through out my graduate study.

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 ABBREVIATIONS.....	xi
 CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	7
III MATERIALS AND METHODS.....	49
IV RESULTS.....	62
V DISCUSSION AND CONCLUSION.....	79
 REFERENCES.....	 85
APPENDIX.....	105
BIOGRAPHY.....	112

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1 General difference between apoptosis and necrosis.....	8
2 Diseases associated with imbalance apoptosis.....	31

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1	Apoptotic signaling21
2	Model for caspase activation by mitochondria.....22
3	Protein that move to and affect mitochondrial membranes.....23
4	Trigger apoptotic signal.....27
5	Diagram illustrating sequence of ultrastructural change.....28
6	Process of <i>in situ</i> terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT assay).....41
7	Demonstrate the slide marking and cover with coverslip.....52
8	Levels of BUN in control, sham, and 1-day to 7-days UUO rats.....64
9	Levels of serum Cr in control, sham, and 1-day to 7-days UUO rats.....64
10	Number of circulating lymphocyte in control, sham, and 1-day to 7-days UUO rats.....65
11	Percentage of cell death in control, sham, and 1-day to 7-days UUO rats.....65
12	Effect of AT1 receptor antagonist (ARA) or ACEI on BUN level in sham, 1-day, and 7-day UUO rats ..66

FIGURE	PAGE
13	Effect of AT1 receptor antagonist (ARA) or ACEI on serum Cr in sham, 1-day, and 7-day UUO rats ...66
14	Effect of AT1 receptor antagonist (ARA) or ACEI on number of circulating lymphocytes in sham, 1-day, and 7-day UUO rats.....68
15	Effect of AT1 receptor antagonist (ARA) or ACEI on percentage of cell death in sham, 1-day, and 7-day UUO rats68
16	The pictures of total and apoptotic cells.....70
17	The positive control slide.....71
18	The negative control slide.....72
19	Pictures of apoptotic cell from 1-day sham groups.....73
20	Pictures of apoptotic cell from 7-day sham groups.....74
21	Pictures of apoptotic cell from 1-day UUO groups.....75
22	Pictures of apoptotic cell from 7-day UUO groups.....76
23	Effect of AT1 receptor antagonist (ARA) or ACEI on apoptotic index in sham, 1-day, and 7-day UUO rats78
24	The proposed mechanisms of angiotensin II that induces apoptosis of circulating lymphocyte.....84

LIST OF ABBREVIATIONS

ACEI	Angiotensin converting enzyme inhibitor
Ang	Angiotensin
ARA	Angiotensin receptor antagonist
BUN	Blood urea nitrogen
Cr	Serum creatinine
°C	Degree Celsius
FITC	Fluorescein isothiocyanate-conjugated
g	Gram
M	Molar
ml	Mililitre
μl	Microlitre
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
rpm	Revolution per minute
UUO	Unilateral ureteral obstruction