การตายของเซลล์บุผิวในหลอดเลือดที่เกิดจากสารพิษในซีรั่ม ของผู้ป่วยไตอักเสบชนิดเนพโฟรสิส : บทบาทของความไม่สมดุลระหว่าง อนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระและการชี้แนะในการรักษา

นางสาวนริสา ฟูตระกูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-03-0885-6
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENDOTHELIAL CELL CYTOTOXICITY INDUCED BY NEPHROTIC SERUM : ROLE OF OXIDANT AND ANTIOXIDANT IMBALANCE AND ITS THERAPEUTIC IMPLICATION

Miss Narisa Futrakul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology

Interdepartment of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0885-6

Thesis Title : ENDOTHELIAL CELL CYTOTOXICITY INDUCED BY NEPHROTIC SERUM : ROLE OF OXIDANT AND ANTIOXIDANT IMBALANCE AND ITS THERAPEUTIC IMPLICATION

By Miss Narisa Futrakul

Field of Study Physiology

Thesis Advisor Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D

Thesis Co-advisor Professor Piyaratana Tosukhowong

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

Suchada Kiranandana
.....Dean of Graduate School

(Professor Dr. Suchada Kiranandana)

THESIS COMMITTEE .....Chairman

(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D)

Piyaratana Tosukhowong
..... Thesis Co-Advisor

(Professor Piyaratana Tosukhowong, MSc)

Narongsak Chaiyabutr
..... Member

(Professor Narongsak Chaiyabutr, DVM, Ph.D)

..... Member

(Professor Achara Sumboonnanonda, MD)

นส.นริสา ฟูตระกูล : การตายของเซลล์บุผิวในหลอดเลือดที่เกิดจากสารพิษในซีรั่มของผู้ป่วยไตอักเสบชนิดเนพ โฟรสิส : บทบาทของความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระและการชี้แนะในการรักษา **อาจารย์ที่ปรึกษา** : รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, **อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** : ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ 80 หน้า ISBN 974-03-0885-6

หลักฐานหลายอย่างบ่งชี้ว่า การทำงานของเซลล์บุผิวในหลอดเลือดโกลเมอรูลัสผิดปกติ อาทิ การลดลงของปริมาณเลือดหล่อเลี้ยงไต สาเหตุของความผิดปกติดังกล่าวยังไม่ปรากฏชัด ภาวะเลือดหล่อเลี้ยงไตพร่องอย่างต่อเนื่องชี้บ่งว่าน่าจะมีต้นเหตุจากสารพิษในเลือดของผู้ป่วยนั้น สารพิษที่ว่านั้นอาจเกิดจากความผิดปกติในระบบอนุมูลอิสระที่มากผิดปกติเนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลมากมายที่เกี่ยวพันอนุมูลอิสระกับการเกิดภาวะไตอักเสบชนิดต่างๆ ข้อสังเกตดังกล่าวข้างต้นนำมาซึ่งการศึกษาวิจัยนี้ **วัตถุประสงค์** (1) ศึกษาผลกระทบของซีรั่มของผู้ป่วยไตชนิดเนฟโฟรสิสต่อการตายของเซลล์บุผิวในหลอดเลือด (ในหลอดทดลอง) (2) ศึกษาสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยและผลกระทบต่อการตายของเซลล์บุผิวในหลอดเลือด (3) การรักษาป้องกันการทำลายไตโดยใช้สารออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระ **ผลการศึกษา** (1) ซีรั่มของ ผู้ป่วยเนฟโฟรสิสเพิ่มอัตราตายของเซลล์บุผิวหลอดเลือดโดยพบ 16.5±5.8% ในกลุ่มโรคไตชนิดไม่รุนแรง (ค่าปกติ 0.6±1.2%) และพบ 35.3±9.6% ในผู้ป่วยชนิดรุนแรง (2) พบความผิดปกติของอนุมูลอิสระที่เพิ่มผิดปกติ อาทิ ในผู้ป่วยชนิดไม่รุนแรง พลาสมา MDA (3.58±0.70 μ M; ค่าปกติ 2.48±1.1 μ M), เม็ดเลือดแดง MDA (12.69±2.67 n M; ค่าปกติ 7.63±0.93 n M) ในผู้ป่วยชนิดรุนแรง พลาสมา MDA (3.71±0.68 μ M) เม็ดเลือดแดง MDA (14.18±4.08 n M) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระมีค่าต่ำกว่าปกติ อาทิ ในผู้ป่วยชนิดไม่รุนแรง GSH (7.35±1.18 μ mol/g Hb, ค่าปกติ 9.09±1.66 μ mol/g Hb), ระดับไวตามิน ซี (1.64±1.43 mg/L; ค่าปกติ 4.79±2.5 mg/L) ระดับไวตามิน อี (0.11±0.05 m M; ค่าปกติ 0.19±0.05 m M) ในผู้ป่วยชนิดรุนแรง GSH (6.19±0.80 μ mol/g Hb), ระดับไวตามิน ซี (0.57±0.74 mg/L), ระดับไวตามิน อี (0.10±0.03 m M) ภายหลังการรักษาด้วยยาขยายหลอดเลือด (enalapril 5-20 มก.ต่อวัน), ไวตามิน ซี (1,000-3,000 มก.) และไวตามิน อี (400-800 ū) พบว่าอัตราตายของเซลล์บุผิวในหลอดเลือดและสมดุลอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระกลับสู่ระดับปกติ (3) การทำงานของไตก่อนรักษาในผู้ป่วยชนิดไม่รุนแรงพบภาวะพร่องเล็กน้อย อาทิ CCr 88±28 มล/นาที/1.73m^2 (ค่าปกติ 120 มล/นาที/1.73m^2), FE Mg 2.9±1%; (ค่าปกติ 2.2%) การตรวจทางโลหิตพลศาสตร์พบค่า renal plasma flow (RPF) 538±146 มล/นาที/1.73m^2 (ค่าปกติ 600 มล/นาที /1.73m^2), peritubular capillary flow (PTCF) 436±142 มล/นาที/1.73m^2 (ค่าปกติ 480 มล/นาที/1.73m^2), efferent arteriolar resistance (RE) 3701±1233 dyne.s.cm^{-5} (ค่าปกติ 3,000 dyne.s.cm^{-5}) และ intraglomerular hydrostatic pressure (PG) 52±1.9 มม ปรอท (ค่าปกติ 53 มม ปรอท) ใน ผู้ป่วยชนิดรุนแรงพบภาวะการทำงานของไตก่อนการรักษาพร่องค่อนข้างมาก อาทิ CCr 44.8±24 มล/นาที/1.73m^2; FE Mg เพิ่มขึ้น 5.6±2.6%, RPF 178±73 มล/นาที/1.73m^2, PTCF 144±67 มล/นาที/1.73m^2, RE 15648±8538 dyne.s.cm^{-5}; PG 55±2 มม ปรอท ภายหลังการรักษาสมรรถภาพการทำงานของไตดีขึ้นอย่างเด่นชัด อาทิ ในกลุ่มผู้ป่วยชนิดไม่รุนแรง CCr เพิ่มขึ้นเป็น 128±68 มล/นาที/1.73m^2, FEMg ลดลงเท่ากับ 1.8±0.6, ในผู้ป่วยชนิดรุนแรง CCr เพิ่มขึ้นเป็น 60±34 มล/นาที/1.73m^2, FEMg ลดลงเท่ากับ 4.1±2.3% การศึกษาทางโลหิตพลศาสตร์พบค่า RPF เพิ่มขึ้นเป็น 347±75 มล/นาที/1.73m^2, PTCF 284±63 มล/นาที/1.73m^2, RE ลดลงเป็น 5302±161/dyne.s.cm^{-5} และค่า PG ลดลงเป็น 51±1 มม ปรอท **สรุป** ผลการศึกษาสนับสนุนว่าความผิดปกติในสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ น่าจะเป็นสารพิษที่ทำให้เซลล์บุผิวในหลอดเลือดตาย (ในหลอดทดลอง) และทำให้การทำงานของเซลล์บุผิวในหลอดเลือด ผิดปกติไป มีผลทำให้เกิดการหดรัดหลอดเลือดในไตที่ผิดปกติของผู้ป่วยเนฟโฟรสิส การรักษาโดยการแก้ไขความผิดปกติดังกล่าวด้วยยาขยายหลอดเลือดและสารต้านอนุมูลอิสระ (การแก้ไขแนวใหม่) ทำให้การทำงานของไตดีขึ้นและสามารถป้องกันการทำลายไตได้

สหสาขาวิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต นริสา ฟูตระกูล

สาขาวิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์

##C 4175435030 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD : entothelium, renal hemodynamics, endothelial cell cytotoxicity, antioxidant, nephrosis.

Narisa futrakul : Endothelial cell cytotoxicity induced by nephrotic serum : role of oxidant and antioxidant imbalance and its therapeutic implication. Thesis advisor : Assoc. Prof. Suthiluk Patumraj, Ph.D. Thesis co-advisor : Prof. Piyaratana Tosukhowong, MSc. 80 pp. ISBN 974-03-0885-6

Background

A glomerular endothelial dysfunction expressed as a reduction in renal perfusion has been substantiated in a variety of chronic renal diseases and in particular in the severe form of idiopathic nephrotic syndrome. The specific information concerning the plausible cause of glomerular endothelial dysfunction remains to be further elucidated. The progressive reduction in renal perfusion as the disease severity progresses provides a hint that certain toxic factor in the serum of such patient is suspected. That the nature of such toxic substance remains to be specifically addressed. In this regard, reactive oxygen species known to be substance that is not only derived from various sources in all cell types but also is upregulated in various renal diseases, appears to be the important candidate that is likely to induce glomerular endothelial dysfunction. The excessive reactive oxygen species are noted to incriminate in the pathogenesis of progressive renal injury in both clinical and experimental settings of acute and chronic glomerular disease. Thus the preceding concerns form the main objectives of this study.

Objectives

The study is aimed to determine (1) the induction of endothelial cell cytotoxicity (ECC) by nephrotic serum in vitro (2) oxidant and antioxidant status in relation to endothelial cell cytotoxicity : effect of oxidative stress (3) the effect of antioxidant and vasodilator therapy in relevant to the endothelial cell function and to the prevention of renal disease progression (by determining the renal functions)

Results

1. Sera from nephrotic patients were capable of inducing ECC in vitro which is in accord with the clinical severity. Sera from the mild form (mesangial proliferative nephrosis) induced 16.5±5.8% ECC whereas sera from the severe form (focal segmental glomerulosclerosis) induced 35.3±9.3% ECC. 2. The oxidant and antioxidant study revealed an oxidant and antioxidant imbalanced state in both mild and severe forms of nephrosis. The initial values of plasma malondialdehyde (MDA) in mild and severe forms of nephrosis were 3.58±0.7 μ M and 3.71±0.68 μ M respectively; versus 2.48±1 μ M of control. The initial values of GSH in mild and severe forms of nephrosis were 7.35±1.18 μ mol/g Hb and 6.19±0.8 μ mol/g Hb respectively; versus 9.09±0.66 μ mol/g Hb of control. The initial values of vitamin C in mild and severe forms of nephrosis were 1.64±1.43 mg/L and 0.57±0.74 mg/L respectively; versus 4.79±2.5 mg/L of control. The initial values of vitamin E in mild and severe forms of nephrosis were 0.11±0.05 m M and 0.10±0.03 n M respectively; versus 0.19±0.05 m M of control. Following the treatment with vitamin C (1,000-3,000 mg), vitamin E (400-800 U) and vasodilator (enalapril 5-20 mg/day), there had been a significant improvement in oxidant and antioxidant status. The plasma and erythrocyte MDA declined to normal level and the GSH, vitamin C and vitamin E were normalised. Such an improvement in oxidant and antioxidant status also correlated with the suppression of ECC observed in nephrosis following the therapy

3. The initial study of renal function revealed a significant impairment in both mild and severe forms of nephrosis. Of the mild form of nephrosis, the initial creatinine clearance (CCr) was 88±28 ml/min/1.73m^2 (normal value 120 ml/min/1.73m^2) and the FEMg was 2.9±1% (normal 2.2%). Of the severe form, the initial CCr was 44.8±24 ml/min/1.73m^2 and the FEMg was 5.6±2.6%. The initial glomerular filtration rate (GFR) in mild and severe forms of nephrosis were 76.5±14.8 ml/min/1.73m^2 and 34±13 ml/min/1.73m^2 respectively. The intrarenal hemodynamic study in mild form of nephrosis revealed a mild impairment. The renal plasma flow (RPF) was 538±146 ml/min/1.73m^2 (normal 600 ml/min/1.73m^2), the peritubular capillary flow (PTCF) was 436±142 ml/min/1.73m^2 (normal 480 ml/min/1.73m^2), the efferent arteriolar resistance (RE) was 3701±1233 dyne.s.cm^{-5} (normal 3000 dyne.s.cm^{-5}). The intraglomerular hydrostatic pressure (PG) was 52±1.9 mm Hg (normal 53 mm Hg). Of the severe form of nephrosis, the RPF was 178±73 ml/min/1.73m^2 , the RE was 15648±8538 dyne.s.cm^{-5} and the PG was 55±2 mm Hg. Following the therapy with antioxidant and vasodilator, there was a significant improvement in renal funciton in both forms of nephrosis. Of the mild form, the CCr increased to 128±68 ml/min/1.73m^2 and FEMg declined to 1.8±0.6%. Of the severe form nephrosis, the CCr rose to 60±34 ml/min/1.73m^2 and the FEMg declined to 4.1±2.3%. The intrarenal hemodynamics revealed a significant improvement: the RPF rose to 347±75 ml/min/1.73m^2, the PTCF rose to 284±63 ml/min/1.73m^2, the RE declined to 5302±161 dyne.s.cm^{-5} and the PG declined to 51±1 mm Hg.

Conclusion The study renders a supportive view that the oxidant and antioxidant imbalance is likely to induce the glomerular endothelial cytotoxicity and dysfunction with subsequent hemodynamic maladjustment in severe nephrosis by which the correction of such disorders by antioxidant therapy and vasodilators (a new therapeutic strategy) can improve the renal function and prevent the renal disease progression.

Inter-Department Physiology	Student's signature	Narisa Futrakul
Field of Study Physiology	Advisor's signature	Suthiluk Patumraj
Academic Year 2544	Co-advisor's signature	Piyaratana Tosukhowong

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D for her excellent instruction, guidance, encouragement and support, which has led me from the beginning of the study to the time of my accomplishment.

I would also like to express my deepest gratitude and appreciation to my co-advisor, Professor Piyaratana Tosukhowong from the Department of Biochemistry for her full support and assistance in the study of oxidant and antioxidant in our renal patients as well as for the providing of the control samples.

My great appreciation would also extend to Professor Stitaya Sirisinha, DDS, Ph.D, Mrs. Tasanee Panichakul, Mrs. Predawan Chaisuriya from the Chulabhorn Research Institute who kindly support the entothelial cell line and methodology and assist in the study of endothelial cell cytotoxicity with valuable guidance, and remarks, to Dr. Julaiporn Somboonwong who exerts a great effort in advising and correcting my proposal's writing.

My great appreciation would also extend to Associate Professor Prasong Siriviriyakul; the chairman of the committee and to all of the Faculty members in the Department of Physiology, to teachers of all classes that I have attended and to my colleagues and students who have participated and provided valuable remarks in the symposium and conferences.

Finally, I would like to extend my great appreciation and thank to the National Research Council of Thailand who supports this study.

CONTENTS

page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS..... vii

List of Tables.....viii

List of Figures.....x

List of Abbreviations xi

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

II BACKGROUND RATIONALE 6

III MATERIAL AND METHODS.....9

IV RESULTS.....17

V DISCUSSION 50

VI SUMMARY 57

REFERENCES.....63

BIOGRAPHY 80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

		PAGE
Table 1	Endothelial cell cytotoxicity	21
Table 1.1	Illustrated the endothelial cell cytotoxicity and renal plasma flow in idiopathic nephrotic syndrome	22
Table 1.2	Illustrated endothelial cell cytotoxicity test during initial and post treatment	23
Table 2	Initial value of oxidant and antioxidant studies in mild nephrosis (MesP-NS)	24
Table 2.1	Initial value of oxidant and antioxidant in severe nephrosis (FSGS)	25
Table 3	Initial and post-treatment value of oxidant and antioxidant in mild nephrosis (MesP-NS)	26
Table 3.1	Initial and post-treatment value of oxidant and antioxidant in severe nephrosis (FSGS)	27
Table 4	Initial and post-treatment values of renal function in mild nephrosis (MesP-NS)	28
Table 4.1	Initial and post-treatment value of renal function in severe nephrosis (FSGS)	29
Table 5	Intrarenal hemodynamics in normal control	30
Table 5.1	Intrarenal hemodynamics in mild nephrosis (MesP-NS)	31
Table 5.2	Comparison of initial intratenal hemodynamics between mild nephrosis (MesP-NS) and control	32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES (Cont.)

PAGE

Table 5.3 Initial renal hemodynamics in severe nephrosis (FSGS) 33

Table 5.4 Post-treatment renal hemodynamics in severe nephrosis (FSGS) 34

Table 5.5 The intrarenal hemodynamic study in severe nephrosis (FSGS) during initial and post-treatment 35

Table 5.6 Urinary protein in Severe nephrosios (FSGS) 36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1	Normal value of intrarenal hemodynamics	37
2	Value of intrarenal hemodynamics in severe nephrosis (FSGS)	38
3	Endothelial cell cytotoxicity in normal compares with severe and mild forms of nephrosis	39
4	Endothelial cell cytotoxicity compares between initial and post treatment	40
5	Values of plasma MDA in control compares with severe and mild forms of nephrosis	41
6	Values of erythrocyte MDA in control compares with severe and mild forms of nephrosis	42
7	Value of GSH in renal patients compares between initial and post treatment	43
8	Value of plasma MDA in renal patients compares between initial and post treatment	44
9	Value of erythrocyte MDA in renal patients compares between initial and post treatment	45
10	Value of vitamin C in renal patient compares between initial and post treatment	46
11	Value of vitamin E in renal patient compares between initial and post treatment	47
12	Value of renal plasma flow in renal patients and normal control	48
13	The spatial relationship between renal perfusion and nephronal damage	49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

CCr	=	Creatinine clearance
DTNB	=	5-5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DTPA	=	^{99m}Tc-labelled diethylene triamine pentaacetic acid
ECC	=	Endothelial cell cytotoxicity
FE Mg	=	Fractional excretion of filtered magnesium
GFR	=	Glomerular filtration rate
GSH	=	Glutathione
MAP	=	Mean arterial pressure
MDA	=	Malondialdehyde
OD	=	Optical density
PF	=	Filtration pressure
PG	=	Intraglomerular hydrostatic pressure
PTCF	=	Peritubular capillary flow
RE	=	efferent arteriolar resistant
RPF	=	Renal plasma flow

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย