

ผลของอะครีโนเมดูลินต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

นางสุภัทรา อมาตยกุล



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคำหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตบัณฑิต

สหสาขาวิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-835-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Mrs. Supathra Amatyakul

Inter – department

Physiology

Thesis Advisor

Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj, Ph.D.


Thesis Co-advisor


Dr. Hideyuki Niimi, Ph.D.


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


-----Dean of Graduate School
(Professor Dr. Suchada Kiranandana, Ph.D.)

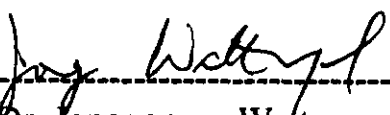
THESIS COMMITTEE


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


-----Thesis Advisor
(Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj, Ph.D.)


-----Thesis Co-advisor
(Dr. Hideyuki Niimi, Ph.D.)


-----Member
(Assistant Professor Dr. Wasan Udayachalerm, M.D.)


-----Member
(Assistant Professor Dr. Jonggonnee Wattnapermpool, Ph.D.)

สุภัทรา อมาตยกุล : ผลของอะดรีโนเมดูลลินต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด (Effect of Adrenomedullin on Cardiovascular System) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ. ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : Dr. Hideyuki Niimi ; 140 หน้า ISBN 974-333-835-7

อะดรีโนเมดูลลินเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 ตัว บทบาทของอะดรีโนเมดูลลินที่ทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตต่ำและการขยายตัวของหลอดเลือด เป็นที่ศึกษากันมาก อย่างไรก็ตามกลไกของอะดรีโนเมดูลลินที่ทำให้เกิดผลดังกล่าวยังเป็นที่ยังไม่เป็นที่ศึกษา การทดลองนี้ได้ศึกษาถึงบทบาทของสารดังกล่าวต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด และกลไกที่ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดโคโรนารี วิชาชีวโมเลกุล 3 แบบในการศึกษาครั้งนี้

การศึกษาทำในหนูแรทเพศผู้พันธุ์วิสตาร์ น้ำหนัก 200-300 กรัม ใน whole body model การให้อะดรีโนเมดูลลิน ขนาด 1 นาโนโมลกก. เข้าทางหลอดเลือดดำ พบว่าทำให้ค่าเฉลี่ยความดันโลหิตลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 30 วินาที (29.86 ± 3.31 มม.ปรอท, $p < 0.001$) และกลับสู่ค่าปกติก่อน 30 นาที โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ การวัดความดันโลหิตค่าที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากการขยายตัวของระบบหลอดเลือดส่วนปลาย จากข้อสันนิษฐานดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษากลไกของอะดรีโนเมดูลลิน ต่อระบบหลอดเลือดของผิวหนังที่หลังหนูแรท โดยใช้ dorsal skinfold chamber model พบว่าเมื่อให้อะดรีโนเมดูลลิน ขนาด 10^{-7} โมลาร์แบบ topical application จะทำให้เกิดการขยายตัวของระบบหลอดเลือดดังกล่าว (เส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดเพิ่มขึ้นจาก 56.80 ± 2.08 ไมโครเมตร เป็น 59.60 ± 2.80 ไมโครเมตร และจาก 35.00 ± 3.83 ไมโครเมตร เป็น 40.40 ± 5.49 ไมโครเมตร ใน second - order และ third - order arteriole ตามลำดับ, $p < 0.05$) ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงผลของอะดรีโนเมดูลลินที่ทำให้เกิดการขยายตัวของระบบหลอดเลือดส่วนปลาย

การศึกษากลไกของอะดรีโนเมดูลลินต่อการทำงานของหัวใจและต่อระบบหลอดเลือดโคโรนารี รวมทั้งการศึกษากลไกในการทำให้หลอดเลือดโคโรนารีขยายตัวทำใน isolated perfused rat heart model โดยพบว่าเมื่อให้อะดรีโนเมดูลลิน 20 ไมโครกรัม เข้าสู่หัวใจจะทำให้การหดตัว ($+dp/dt_{max}$) และคลายตัว ($-dp/dt_{min}$) ของหัวใจลดลง ($+dp/dt_{max}$ ลดลงจาก 1740 ± 78 มม.ปรอท/วินาที เป็น 1678 ± 89 มม.ปรอท/วินาที, $p < 0.05$; $-dp/dt_{min}$ ลดลงจาก 941 ± 55 มม.ปรอท/วินาที เป็น 897 ± 62 มม.ปรอท/วินาที, $p < 0.05$) ขณะที่อัตราการเต้นของหัวใจ เพิ่มขึ้นจาก 278 ± 6 ครั้ง/นาที เป็น 305 ± 9 ครั้ง/นาที, $p < 0.01$ และอัตราการไหลของเลือดผ่านระบบหลอดเลือดโคโรนารี (CBF) เพิ่มขึ้นจาก 7.00 ± 0.27 มล./นาที เป็น 8.32 ± 0.29 มล./นาที, $p < 0.001$ ไม่พบว่าอะดรีโนเมดูลลินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคลื่นไฟฟ้าหัวใจหรือการสร้า cyclic AMP ในหัวใจอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากทำลายเอ็นโดเธลิอัมโดยใช้ Triton X-100 พบว่าผลของอะดรีโนเมดูลลินต่อการทำให้หลอดเลือดโคโรนารีขยายตัวนั้นมีค่าลดลง (CBF เพิ่มขึ้น $15.70 \pm 0.91\%$ ในกลุ่มที่ไม่มีการทำลายเอ็นโดเธลิอัม และเพิ่มขึ้นเพียง $4.64 \pm 1.50\%$ ในกลุ่มที่มีการทำลายเอ็นโดเธลิอัม, $p < 0.001$) นอกจากนี้พบว่า L-NNA ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสร้า nitric oxide และ glibenclamide ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเปิดของ K_{ATP} channels ทำให้ผลการขยายหลอดเลือดโคโรนารีของอะดรีโนเมดูลลินลดลง (CBF เพิ่มขึ้น $18.93 \pm 1.42\%$ ในกลุ่มที่ได้รับอะดรีโนเมดูลลินเพียงอย่างเดียว โดยเพิ่มขึ้นเพียง $14.90 \pm 1.22\%$ ในกลุ่มที่ได้รับอะดรีโนเมดูลลินร่วมกับ L-NNA, $p < 0.05$ และ เพิ่มขึ้นเพียง $5.46 \pm 0.67\%$ ในกลุ่มที่ได้รับอะดรีโนเมดูลลินร่วมกับ glibenclamide, $p < 0.001$ โดย indomethacin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสร้า prostaglandin ไม่มีผลดังกล่าว ผลการทดลองนี้อาจทำให้สรุปได้ว่าอะดรีโนเมดูลลินทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดโคโรนารีโดยมีกลไกหลักที่ผ่านเอ็นโดเธลิอัม ซึ่งพบว่าการทำงานของ nitric oxide จากเอ็นโดเธลิอัม และการกระตุ้น K_{ATP} channels ที่เอ็นโดเธลิอัมและที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดมีบทบาทสำคัญ

ภาควิชา..... สรีรวิทยา..... นายมือชื่อนิติ..... นิธิ อธิมา
 สาขาวิชา..... สาขาวิชาสรีรวิทยา..... นายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... สุทธิลักษณ์ ปทุมราช
 ปีการศึกษา..... 2542..... นายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... H. Niimi



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 Srikiatkachorn 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

| | PAGE |
|--------------------------------|------|
| THAI ABSTRACT..... | iv |
| ENGLISH ABSTRACT..... | v |
| ACKNOWLEDGEMENTS..... | vi |
| CONTENTS..... | vii |
| LIST OF TABLES..... | viii |
| LIST OF FIGURES..... | x |
| ABBREVIATIONS..... | xiii |
| CHAPTER | |
| I. INTRODUCTION..... | 1 |
| II. MATERIALS AND METHODS..... | 44 |
| III. RESULTS..... | 60 |
| IV. DISCUSSION..... | 95 |
| V. CONCLUSION..... | 113 |
| REFERENCES..... | 115 |
| APPENDIX..... | 134 |
| PUBLICATIONS..... | 139 |
| BIOGRAPHY..... | 140 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

| TABLE | PAGE |
|---|-------------|
| 3.1 The effect of intravenous injection of adrenomedullin (1 nmol/kg BW) on mean arterial blood pressure..... | 62 |
| 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 adrenomedullin (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 μ g) 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 μ g) in isolated perfused rat heart..... | 71 |
| 3.7 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 μ g) 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 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

สถาบันวิทยบริการ
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 fluorescent microscopy and schematic of arteriole shows the reference point A and the defined point B and C..... | 50 |
| 2.3 The screen of the computer set displaying signals of the cardiac parameters during the experiment..... | 54 |
| 2.4 The experimental set-up and block diagram of the measuring devices used on the isolated perfused rat heart according to LANGENDORFF..... | 56 |
| 3.1 Time course of mean blood pressure following intravenous administration of adrenomedullin (1 nmol/kg BW)..... | 63 |
| 3.2 Percent changes of arteriolar diameter with time after topical application of adrenomedullin at 10^{-7} M on rat skin microcirculation..... | 66 |

| | |
|--|----|
| 3.3 The example of intravital fluorescent videoscopic images of the second and the third-order arterioles recorded from one experiment..... | 67 |
| 3.4 Time course of maximum rate of cardiac contraction following bolus injection of adrenomedullin (20 μg) in isolated perfused rat heart..... | 72 |
| 3.5 Time course of maximum rate of cardiac relaxation following bolus injection of adrenomedullin in isolated perfused rat heart..... | 73 |
| 3.6 Time course of heart rate following bolus injection of adrenomedullin (20 μg) in isolated perfused rat heart..... | 74 |
| 3.7 Time course of coronary blood flow following bolus injection of adrenomedullin (20 μg) in isolated perfused rat heart..... | 75 |
| 3.8 The example of electrocardiogram recorded from one experiment of the isolated perfused rat heart before and after bolus injection of adrenomedullin (20 μg)..... | 76 |
| 3.9 Comparison of percentage changes in coronary blood flow following bolus injection of bradykinin (0.1 μg) in endothelium-intact and endothelium-damaged coronary arteries and following bolus injection of sodium nitroprusside (15 μg) in endothelium-damaged coronary arteries of isolated perfused arrested rat heart..... | 83 |
| 3.10 The effect of indomethacin on adrenomedullin-induced increase in coronary blood flow of isolated perfused rat heart..... | 91 |
| 3.11 The effect of N^{G} -nitro-L-arginine on adrenomedullin-induced increase in coronary blood flow of isolated perfused rat heart..... | 92 |

- 3.12 The effect of glibenclamide on adrenomedullin-induced increase in coronary blood flow of isolated perfused rat heart.....93
- 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 hearts.....94
- 4.1 The proposed mechanism of adrenomedullin-induced coronary vasodilation in isolated perfused rat heart model.....105
- 4.2 Schematic diagram shows three major mechanisms of endothelium-derived vasodilation.....107



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | Degree celcius |
| Ca^{2+} | = | Calcium ion |
| $[\text{Ca}^{2+}]_i$ | = | Intracellular calcium concentration |
| CaCl_2 | = | Calcium chloride |
| cAMP | = | Cyclic adenosine monophosphate |
| CBF | = | Coronary blood flow |
| cGMP | = | Cyclic guanosine monophosphate |
| CGRP | = | Calcitonin gene - related peptide |
| $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | = | Glucose |
| CO_2 | = | Carbon dioxide |
| DMSO | = | Dimethyl sulfoxide |
| $+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ | = | Maximal positive derivative |
| $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ | = | 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 |
| KH_2PO_4 | = Potassium dihydrogen phosphate |
| L-NNA | = N^G - Nitro - L - arginine |
| M | = Molar |
| MAP | = Mean arterial pressure |
| mg | = Milligram |
| $MgSO_4$ | = Magnesium sulphate |
| min | = Minute |
| ml | = Millilitre |
| mm | = Millimeter |
| mmHg | = Millimeter mercury |
| NaCl | = Sodium chloride |
| $NaHCO_3$ | = 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 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย