

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46277

CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF GRANULOCYTE-COLONY
STIMULATING FACTOR (G-CSF) AGAINST MITOCHONDRIAL
DAMAGE UNDER HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED
OXIDATIVE STRESS CONDITION IN ISOLATED
CARDIAC MITOCHONDRIA

SAVITREE TRUMMASORN

MASTER OF SCIENCE
IN PHYSIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY

JULY 2010

600256112

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46277

**CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF GRANULOCYTE-COLONY
STIMULATING FACTOR (G-CSF) AGAINST MITOCHONDRIAL
DAMAGE UNDER HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED
OXIDATIVE STRESS CONDITION IN ISOLATED
CARDIAC MITOCHONDRIA**



SAVITREE THUMMASORN

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
IN PHYSIOLOGY**

**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY**

JULY 2010

**CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF GRANULOCYTE-COLONY
STIMULATING FACTOR (G-CSF) AGAINST MITOCHONDRIAL
DAMAGE UNDER HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED
OXIDATIVE STRESS CONDITION IN ISOLATED
CARDIAC MITOCHONDRIA**

SAVITREE THUMMASORN

**THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PHYSIOLOGY**

EXAMINING COMMITTEE

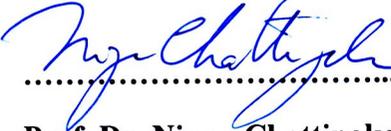
.....CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn

.....MEMBER

Dr. Sarawut Kumphune

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR

Prof. Dr. Nipon Chattipakorn

.....CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Orawan Wongmekiat

29 July 2010

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENT

Firstly, I would like to show my deep appreciation to my thesis advisor, Professor Dr. Nipon Chattipakorn who really deserves the greatest thanks since he has provided me incredible support, encouragement and guidance in the research. This thesis could not be accomplished without his kindly advice and encouragement.

Special appreciation are extended to Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn from Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, for constructive comments in this thesis. In addition, I would like to thank Mr. Punate Weerateerangkul and Miss Sirinart Kumfu from Cardiac Electrophysiology Research and Training Center (CERT), Faculty of Medicine, Chiang Mai University for the technical help in this study. I would like to thank to all staff at CERT center for guidance and friendship. I also need to express special acknowledgement to Thailand Research Fund for financial support in this study.

Finally, I would like to thank my family for love, understanding, support that inspired me to reach goal. Also, I will keep in mind for the love and care that were received from other people whom I did not mention here.

Savitree Thummasorn

Thesis Title	Cardioprotective Effects of Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) Against Mitochondrial Damage Under Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress Condition in Isolated Cardiac Mitochondria
Author	Miss SavitreeThummasorn
Degree	Master of Science (Physiology)
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Nipon Chattipakorn, M.D., Advisor Assoc.Prof.Dr. Orawan Wongmekiat, Co-advisor

ABSTRACT

E46277

During cardiac ischemia-reperfusion (I/R) injury, the level of reactive oxygen species (ROS) is markedly increased, leading to oxidative stress in cardiomyocytes and eventually resulting in cardiac mitochondrial dysfunction. Recently, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) has been reported to have cardioprotective effect in ischemic heart. However, its effects on cardiac mitochondria during oxidative stress have never been investigated. We tested the hypothesis that under oxidative stress G-CSF can prevent cardiac mitochondrial dysfunction by preventing mitochondrial swelling, decreasing the ROS production and attenuating mitochondrial depolarization. **Methods:** Isolated cardiac mitochondria obtained from the heart of Wistar rats were used. H₂O₂ at 2 mM was used to induce oxidative stress in cardiac mitochondria. G-CSF at various concentrations was used to study its

E 46277

protective effects on mitochondrial swelling, mitochondrial membrane potential changes ($\Delta\Psi_m$) and ROS production. Cyclosporine A (CsA, a mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor) and 4'-chlorodiazepam (CDP, an inner membrane anion channel (IMAC) blocker) were used to investigate the mechanism of G-CSF on cardiac mitochondria. **Results:** G-CSF completely prevented mitochondrial swelling and depolarization, and markedly reduced ROS production caused by H_2O_2 -induced oxidative stress condition. Its effects on mitochondrial swelling and $\Delta\Psi_m$ were similar to those in CsA and CDP, whereas its protective effects on ROS production was less effective than CsA and CDP. **Conclusions:** G-CSF could prevent mitochondrial swelling, mitochondrial membrane depolarization, and attenuate ROS production under H_2O_2 -induced oxidative stress condition. Its protective mechanism could be via blocking mPTP opening.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลในการป้องกันหัวใจของแกรนูโลไซต์-โคโลนี สติมูเลติง แฟคเตอร์ ต่อความเสียหายของไมโทคอนเดรียภายใต้ภาวะเครียดจนเกิดออกซิเดชันซึ่งกระตุ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในไมโทคอนเดรียของหัวใจ	
ผู้เขียน	นางสาว สาวิตรี ธรรมสอน	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. นพ. นิพนธ์ ฉัตรทิพากร	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. อรวรรณ วงศ์มีเกียรติ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E46277

ในภาวะหัวใจขาดเลือดนั้นพบว่าภายในหัวใจจะมีระดับของรีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์หรือ อาร์ โอ เอส เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งภายหลังผลที่เกิดขึ้นนี้จะนำไปสู่การเกิดภาวะเครียดจนเกิดออกซิเดชันและภาวะที่ทำให้เกิดไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติได้ เมื่อไม่นานนี้ด้วยที่ชื่อว่าแกรนูโลไซต์-โคโลนี สติมูเลติง แฟคเตอร์หรือ จี-ซีเอสเอฟ มีการรายงานว่ามีส่วนในการป้องกันหัวใจจากภาวะหัวใจขาดเลือดได้ อย่างไรก็ตามผลของจี-ซีเอสเอฟ ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียยังไม่เคยมีการถูกทดสอบ ดังนั้นในการศึกษานี้เราจึงทำการทดสอบสมมุติฐานที่ว่าจี-ซีเอสเอฟสามารถช่วยป้องกันการเกิดไมโทคอนเดรียจากภาวะผิดปกติต่างๆเช่น ป้องกันภาวะไมโทคอนเดรียบวม, ลดระดับการสร้างอาร์ โอ เอส และลดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าของเมมเบรนไมโทคอนเดรียได้ **วิธีการทดลอง:** ไมโทคอนเดรียจะถูกแยกออกจากหัวใจของหนูพันธุ์วิสตา จากนั้นไมโทคอนเดรียจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดจนเกิดออกซิเดชันโดยการให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ จี-ซีเอสเอฟที่ความเข้มข้นต่างๆจะถูกนำมาใช้ในการศึกษา ภาวะไมโทคอนเดรียบวม, ภาวะการเปลี่ยนแปลงโพเทนเชียลของเมมเบรนไมโทคอนเดรีย และ ระดับการสร้างอาร์ โอ เอสในไมโทคอนเดรีย ในการศึกษานี้จะใช้ไซโครสปอริน เอ (ซี เอส เอ) (สารที่ยับยั้งการเปิดของ เอม พี ที พี) และ โฟฟลามคลอโรไดซีเปม (ซี ดี พี) (สารที่ยับยั้งการเปิดของ ไอ เอ็ม เอ ซี) มาทำการศึกษากลไกการทำงานของ จี-ซีเอสเอฟ ต่อไมโทคอนเดรียของหัวใจ ผลการศึกษา: จี-ซีเอสเอฟ สามารถช่วยป้องกันภาวะไมโทคอนเดรียบวม, ภาวะการเปลี่ยนแปลงความต่าง

E46277

ศักย์ไฟฟ้าของเมมเบรนไมโทคอนเดรีย และ ลดระดับการสร้างอาร์ โอ เอสในไมโทคอนเดรียของหัวใจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดจนเกิดออกซิเดชัน โดยผลการศึกษาของจี-ซีเอสเอฟ สามารถป้องกันภาวะไมโทคอนเดรียบวมและเกิดที่ภาวะการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าของเมมเบรนไมโทคอนเดรียได้เหมือนกับผลของยา ซี เอส เอ และ ซี ดี พี แต่มีผลในการลดระดับการสร้างอาร์ โอ เอสได้น้อยกว่า ซี เอส เอและ ซี ดี พี **สรุปผลการศึกษา:** จี-ซีเอสเอฟ สามารถช่วยป้องกันภาวะไมโทคอนเดรียบวม, ภาวะการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าของเมมเบรนไมโทคอนเดรีย และ ลดระดับการสร้างอาร์ โอ เอสในไมโทคอนเดรียของหัวใจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดจนเกิดออกซิเดชันโดยการให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่านทางกลไกการยับยั้งการเปิดของ เอ็ม พี ที พี ได้

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iv
ABSTRACT (IN THAI)	vi
LIST OF FIGURES	xi
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xii
CHAPTER I: INTRODUCTION	
1.1 Statement and significance of the problem	1
1.2 Literature review	
1.2.1 The structure of granulocyte colony-stimulating factor	4
1.2.2 G-CSF-induced bone marrow mobilization	6
1.2.3 Relationship between G-CSF and myocardium infarction condition	7
1.2.4 The relation between oxidative stress condition and cardiac cell death	11

1.2.5 Relationship between G-CSF and oxidative stress condition	12
1.2.6 Mechanism of G-CSF on myocardial infarction	14
1.2.7 Clinical study	15
1.3 Hypothesis of the study	18
1.4 Objective of this study	18

CHAPTER II: MATERIALS AND METHODS

2.1 Instrument, equipment, chemicals and reagents	21
2.2 Animal Preparation	21
2.3 Study Protocols	
2.3.1 Protocol I: To identify the cardiac mitochondria with electron microscopy	24
2.3.2 Protocol II: To study the effects of G-CSF on mitochondrial swelling in isolated mitochondria	24
2.3.3 Protocol III: To study the effects of G-CSF on ROS production in isolated mitochondria	25
2.3.4 Protocol IV: To study the effects of G-CSF on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) changes in isolated mitochondria	25

CHAPTER III: RESULTS

3.1 Effects of G-CSF on mitochondrial swelling	29
3.2 Effects of G-CSF on ROS production	35
3.3 Effects of G-CSF on mitochondrial membrane potential changes	35
3.4 Effect of G-CSF, CsA and CDP on cardiac mitochondrial swelling	38
3.5 Effects of G-CSF, CsA and CDP on ROS production	40
3.6 Effects of G-CSF , CsA and CDP on mitochondrial membrane potential changes	42

CHAPTER IV: DISCUSSION AND CONCLUSIONS 44**REFERENCES** 50**APPENDICES**

APPENDIX A	65
------------	----

APPENDIX B	67
------------	----

APPENDIX C	69
------------	----

CURRICURUM VITAE 72

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1-1 The structure of granulocyte colony-stimulating factor	5
1-2 G-CSF effects on myocardial infarction	11
1-3 The mechanism of G-CSF on myocardial infarction	15
3-1 The identification of the mitochondria with transmission electron microscope	31
3-2 The effects of G-CSF preincubation duration, prior H ₂ O ₂ application, on mitochondrial swelling	32
3-3 The effects of G-CSF on mitochondrial swelling	33
3-4 The effects of G-CSF on mitochondrial swelling at 4 minute	34
3-5 The effects of G-CSF on ROS production	36
3-6 The effects of G-CSF on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) changes	37
3-7 The effects of G-CSF, CsA and CDP on mitochondrial swelling at 4 minute	39
3-8 The effects of G-CSF, CsA and CDP on ROS production	41
3-9 The effects of G-CSF, CsA and CDP on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) changes	43

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

%	Persent
°C	Degree Celsius
µg	Microgram
µl	Microliter
µM	Micromolar
mM	Millimolar
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
ROS	Reactive oxygen species
ETC	Electron transport chain
$\Delta\Psi_m$	Mitochondrial membrane potential
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MPT	Mitochondrial permeability transition
mBZR	Mitochondrial benzodiazepine receptor
AMI	Acute myocardial infarction
HSCs	Hematopoietic stem cells
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
MMPs	Matrix metalloproteinases
O ₂ [·]	superoxide anion
EF	Ejection fraction
PCI	Percutaneous coronary intervention
DCFDA	Dichlorohydro-fluorescein diacetate
CsA	Cyclosporine A
CDP	4'-chlorodiazepam
IMAC	Inner membrane anion channel