

**REDOX INVOLVEMENT OF P53 PROTEIN SUBCELLULAR
LOCALIZATION AND FUNCTION IN CARDIOMYOCYTES
DURING ACUTE ADRIAMYCIN-INDUCED
CARDIOTOXICITY *IN VIVO***

RAMANEEYA NITHIPONGVANITCH

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

บทบาทและความสำคัญของโปรตีน P53 ซึ่งเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระในกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อหัวใจโดยยา ADRIAMYCIN (REDOX INVOLVEMENT OF P53 PROTEIN SUBCELLULAR LOCALIZATION AND FUNCTION IN CARDIOMYOCYTES DURING ACUTE ADRIAMYCIN-INDUCED CARDIOTOXICITY *IN VIVO*)

รัชนีชา นิธิพงษ์วนิช 4536724 MTMT/D

ปร.ค. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วนิดา อัฐรัตน์, Ph.D., TERRY D. OBERLEY, M.D. Ph.D., ศรีสุรางค์ ดันติมาวานิช, Ph.D.

บทคัดย่อ

ยาต้านมะเร็ง ADRIAMYCIN ทำให้เกิดผลแทรกซ้อนที่เป็นพิษต่อเซลล์หัวใจ จากการศึกษาพบว่าโปรตีน p53 เกี่ยวข้องในการเกิดพิษของหัวใจซึ่งกลไกนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ระดับโปรตีนและหน้าที่ที่เกี่ยวข้องของโปรตีน p53 ในส่วนต่างๆ (โดยเฉพาะนิวเคลียส และ ไมโทคอนเดรีย) ของเซลล์หัวใจหนูที่ได้รับยา ADRIAMYCIN รวมไปถึงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน p53 และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากยา ADRIAMYCIN ในการควบคุมระดับโปรตีน p53 และการกระตุ้นกลไกในเซลล์หัวใจอันจะนำไปสู่การตายของเซลล์หัวใจ

จากผลการศึกษาพบว่า ADRIAMYCIN กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มระดับของโปรตีน p53 ในไมโทคอนเดรียและนิวเคลียสของเซลล์หัวใจ นอกจากนี้ยังพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของโปรตีนต่างๆ ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีน p53 และโปรตีนที่นำไปสู่การตายของเซลล์ ได้แก่ BAX, PUMA, CYTOCHROME C, และ CASPASES การเพิ่มขึ้นของโปรตีน p53 ในไมโทคอนเดรียสัมพันธ์กับระดับ DNA ในไมโทคอนเดรียที่เสียหายหลังจากได้รับยา ADRIAMYCIN และความเสียหายยังเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์หัวใจของหนูซึ่งขาดแคลนโปรตีน p53 การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ไม่สามารถตรวจพบได้ในเซลล์หัวใจของหนูที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพื่อป้องกันการเพิ่มระดับของอนุมูลอิสระในเซลล์หัวใจจากยา ADRIAMYCIN นอกจากนี้แล้วเมื่อวัดระดับของสารเคมีที่แสดงถึงความเสียหายของการเกิดอนุมูลอิสระ พบว่าการเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์หัวใจของหนูกลุ่มควบคุม และลดลงในเซลล์หัวใจของหนูซึ่งขาดแคลนโปรตีน p53 ที่ได้รับยา

ADRIAMYCIN

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน p53 ในนิวเคลียสมีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษในหัวใจจากผลข้างเคียงของยา ADRIAMYCIN ส่วนการเพิ่มขึ้นของโปรตีน p53 ในไมโทคอนเดรียของเซลล์หัวใจอาจเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA ที่เสียหายจากอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ การศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน p53 และอนุมูลอิสระ พบว่าอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากยา ADRIAMYCIN สามารถควบคุมระดับของโปรตีน p53 ในขณะที่โปรตีน p53 ที่เพิ่มขึ้นก็มีส่วนนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของระดับอนุมูลอิสระในเซลล์ ซึ่งทั้งหมดนี้อาจเป็นกลไกของยา ADRIAMYCIN อันจะนำไปสู่การเสียหายและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

REDOX INVOLVEMENT OF P53 PROTEIN SUBCELLULAR
LOCALIZATION AND FUNCTION IN CARDIOMYOCYTES DURING
ACUTE ADRIAMYCIN-INDUCED CARDIOTOXICITY *IN VIVO*

RAMANEEYA NITHIPONGVANITCH 4536724 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: WANIDA ITTARAT, Ph.D., TERRY D. OBERLEY, M.D.,
Ph.D., SRISURANG TANTIMAVANICH, Ph.D.

ABSTRACT

It has been proposed that the tumor suppressor p53 protein play a role during Adriamycin (ADR)-induced cardiotoxicity; however, the mechanisms involved are not yet completely understood. The current study was designed to analyze levels, subcellular localization, and possible function(s) of p53 in the cardiomyocyte response to ADR. In addition, the involvement of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in regulation of p53 subcellular levels as well as modulation of p53-mediated signaling pathways were determined in cardiomyocytes after ADR administration.

ADR induced up-regulation of p53 protein in cardiomyocyte mitochondria and nuclei between 3-24 h in wild type mice. Increased expression of PUMA and Bax proteins, pro-apoptotic targets of p53, was documented following ADR treatment and was accompanied by increased levels of apoptotic markers, with elevation of cytosolic cytochrome c at 24 h and subsequent caspase-3 cleavage at 3 days. Mitochondrial p53 levels correlated with mitochondrial DNA (mtDNA) oxidative damage. Loss of p53 in knockout mouse hearts resulted in a significant increase in mtDNA vulnerability to damage following ADR treatment. Modulation of cardiomyocyte redox state in genetically engineered mice by modulation of enzymes involved in metabolism of ROS/RNS, manganese superoxide dismutase (MnSOD) and/or inducible nitric oxide synthase (iNOS), modulated levels of mitochondrial/nuclear p53 in cardiomyocytes following ADR treatment. Additionally, an elevation of 4-hydroxy-2-nonenal protein adducts (4-HNE), a biomarker of oxidative damage, observed in wild type mice decreased in p53-deficient cardiomyocytes with subsequently attenuated cardiomyocyte injury following exposure to ADR.

The present study provides evidence that nuclear p53 protein plays a role during ADR-induced cardiotoxicity while mitochondrial p53 could participate in mtDNA repair as a first response to oxidative damage of cardiomyocyte mtDNA. ROS/RNS generation by ADR may act as an upstream mediator that regulates p53 mitochondrial/nuclear localization and functions as well as a downstream effector of p53 which may be an important mechanism that contributes to cardiomyocyte injury and apoptosis.

KEY WORDS: ADRIAMYCIN / CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS / p53 /
MnSOD / MITOCHONDRIA

155 pp.