20 JAN 2003

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CHARACTERIZATION OF IMIDAZOLINE RECEPTOR ON PORCINE RENAL CORTEX MEMBRANES

PATTRAPORN PUKKLAY

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(PHARMACOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-2602-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P322C
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4236693 SCPM/M : MAJOR : PHARMACOLOGY ; MSc. (PHARMACOLOGY)
KEYWORDS : IMIDAZOLINE RECEPTOR/ PORCINE RENAL CORTEX SIGNAL TRANSDUCTION

PATTRAPORN PUKKLAY: CHARACTERIZATION OF IMIDAZOLINE RECEPTOR ON PORCINE RENAL CORTEX MEMBRANES. THESIS ADVISORS: DARAWAN PINTHONG, Ph.D., YUPIN SANVARINDA, Ph.D., SURIN PLASEN, M.D., Ph.D. 70P. ISBN 974-04-2602-6

The aim of this study is to characterize the subtype of imidazoline receptors (IR) and to determine receptor density and affinity of imidazoline receptors on porcine renal cortex membranes.

From a saturation binding assay, the maximum receptor density of IR on porcine renal cortex membranes labeled by [^{3}H]-clonidine was 390.2± 89.09 fmol/mgprotein with a Kd value of 9.69±3.8 nM. The maximum receptor density of an I_2 receptor on porcine renal cortex membranes labeled by [^{3}H]-idazoxan was 655.6± 49.17 fmol/mgprotein with a Kd value of 8.49±1.29 nM. The results revealed that [^{3}H]-idazoxan binding sites (I_2 site) were 1.7 fold higher than those of [^{3}H]-clonidine binding whereas the affinities were comparable. In a competitive binding assay, I_1 ligands, clonidine, rilmenidine, moxonidine, surprisingly competed with low affinities to an I-site labeled by [^{3}H]-clonidine. The rank order of potency of competing ligands was : idazoxan (459±1.33 nM) > clonidine (730±1.31 nM) > rilmenidine (2,769±1.26 nM) > oxymetazoline (9,204±4.41 nM) > moxonidine = efaroxan (>10^5 nM). The results showed that this site differed from the typical I_1 sites. This site may be a new subtype of imidazoline receptor or a nonfunctional receptor. On the contrary, a selective I_2 receptor ligand, idazoxan, competed with a very high affinity to a [^{3}H]-idazoxan binding site whereas I_1 receptor ligands, clonidine, rilmenidine, moxonidine, oxymetazoline and efaroxan also competed with very low affinity to an I_2 site. The rank order of potency was : idazoxan (0.579±0.06 nM) > clonidine (16,100±0.15nM) > rilmenidine (18,900±3.4nM) > oxymetazoline (42,300±33.2 nM) > moxonidine = efaroxan (>10^5 nM). The results from this study suggested that the major imidazoline receptor subtype on porcine renal cortex is the I_2 site. In addition, in GTP shift assay, Gpp(NH)p did not change the affinity of the idazoxan binding to this site. This result suggested that [^{3}H]-idazoxan binding site was not a G-protein coupled receptor.

In conclusion, I_2 receptors are the main subtype existing on porcine renal cortex membranes and are suggested to be the functional receptors in the kidneys whereas an I site labeled with [^{3}H]-clonidine is different from the typical I_1 site. This site may be a new subtype of imidazoline receptor.

Copyright by Mahidol University

4236693 SCPM/M : สาขาวิชา: เภสัชวิทยา; วท.ม. (เภสัชวิทยา)

ภัทราพร ผูกคล้าย : การศึกษาคุณสมบัติของตัวรับอิมมิดาโซลีนบนส่วนเปลือกนอกของไตหมู (CHARACTERIZATION OF IMIDAZOLINE RECEPTOR ON PORCINE RENAL CORTEX MEMBRANES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ดาราวรรณ ปิ่นทอง, Ph.D., ยุพิน สังวรินทะ, ปร.ด., สุรินทร์ พลเสน, พ.บ., ปร.ด.70 หน้า ISBN 974-04-2602-6

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อทำการตรวจหาคุณสมบัติของsubtypes' ของตัวรับอิมมิดาโซลิน และเพื่อหาค่า ความหนาแน่นของตัวรับ (Bmax) และค่าความสามารถในการจับ (Kd) ของตัวรับอิมมิดาโซลีนบนส่วนเปลือกนอกของไตหมู

จากการศึกษาโดยวิธี Saturation binding assay พบว่าค่า Bmax ของตัวรับอิมมิดาโซลีนที่ติดฉลากด้วย [^{3}H]-clonidineมีค่าเท่ากับ 390.2±89.09 เฟมโทโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีค่า Kd เท่ากับ 9.69±3.8 นาโนโมลาร์ ขณะที่ค่า Bmax ของตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่2 (I_2 site)มีค่าเท่ากับ 655.6±49.17 เฟมโทโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีค่า Kd เท่ากับ 8.49±1.29 นาโนโมลาร์ จากผลการศึกษานี้พบว่าที่ส่วนเปลือกนอกของไตหมูมีตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่2 มีจำนวนมากเป็น 1.7 เท่าของตัวรับอิมมิดาโซลีนที่ติดฉลากด้วย [^{3}H]-clonidine และจากการศึกษา Competitive binding assay เพื่อเปรียบเทียบลักษณะการจับของ ligands ที่ตัวรับชนิดที่1 ซึ่งติดฉลากด้วย [^{3}H]-clonidine และตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่2ที่ติดฉลากด้วย [^{3}H]-idazoxan จากผลการศึกษาพบว่าสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็นอิมมิดาโซลินและมีความจำเพาะต่อตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่1 มีค่าความสามารถในการจับที่ [^{3}H-] clonidine binding site ได้ต่ำและสามารถเรียงลำดับความสามารถในการจับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ idazoxan (459±1.33 นาโนโมลาร์) > clonidine (730±1.31 นาโนโมลาร์) > rilmenidine (2,769±1.26 นาโนโมลาร์) > oxymetazoline (9,204±4.41 นาโนโมลาร์) > moxonidine = efaroxan (>10^5 นาโนโมลาร์) ซึ่งลำดับในการจับที่ตัวรับที่ติดฉลากด้วย [^{3}H]-clonidine แตกต่างจากลำดับของสารที่จับตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่1ที่ทราบกันดี ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ [^{3}H]-idazoxan binding site พบว่า idazoxan ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะต่อตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่2มีค่าความสามารถในการจับที่[^{3}H]-idazoxan binding siteสูง ขณะที่clonidine, rilmenidine, moxonidine, oxymetazoline และefaroxan ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะต่อตัวรับชนิดที่1 มีค่าความสามารถในการจับที่siteนี้ต่ำและสามารถเรียงลำดับความสามารถในการจับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ idazoxan (0.58±0.06 นาโนโมลาร์) > clonidine (16,100±0.12 นาโนโมลาร์) > rilmenidine (18,900±3.4 นาโนโมลาร์) > oxymetazoline (42,300±33.2 นาโนโมลาร์) > moxonidine=efaroxan (10^{-5} นาโนโมลาร์) นอกจากนี้ในการศึกษา GTP shift assay พบว่า Gpp(NH)p ไม่มีผลต่อการจับของidazoxanที่ตัวรับชนิดที่2แสดงว่าตัวรับชนิดที่2ไม่ใช่ตัวรับชนิดที่จับกับ G protein ดังนั้นจากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า [^{3}H]idazoxan binding site หรือตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่2ที่ส่วนเปลือกนอกของไตหมูเป็นตัวรับที่สำคัญต่อสารที่มีสูตรโครงสร้างที่เป็นอิมมิดาโซลิน

การศึกษานี้สรุปได้ว่าบนส่วนเปลือกนอกของไตหมูมีตัวรับอิมมิดาโซลินทั้ง2 ชนิด แต่ตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่1 มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่1ที่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งอาจจะเป็นตัวรับชนิดใหม่ ขณะที่ตัวรับอิมมิดาโซลินชนิดที่2น่าจะเป็นตัวรับที่ไตที่มีบทบาทสำคัญเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็นอิมมิดาโซลินซึ่งควรจะมีการศึกษาทางด้านบทบาทหน้าที่ของตัวรับชนิดนี้ที่ไตต่อไป

Copyright by Mahidol University