

# กลไกการออกฤทธิ์ของสติไวโอไซด์ต่อสรีรวิทยาของไตในหนูแรท

นางสาวธมลวรรณ ส่วนอรุณสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สหสาขาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-604-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 1727631X

**THE MECHANISM OF ACTION OF STEVIOSIDE  
ON RENAL FUNCTION IN RAT**

**Miss Thamolwan Suanarunsawat**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Degree of Doctor of Philosophy in Inter-Department of Physiology**

**Faculty of Medicine**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

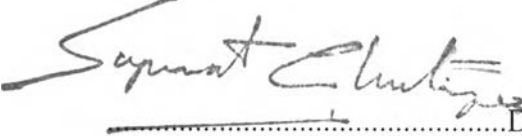
**Academic Year 1996**

**ISBN 974-636-604-1**


Thesis Title            The mechanism of action of stevioside on renal function in rat  
By                        Miss Thamolwan Suanarunsawat  
Inter-Department      Physiology  
Thesis Advisor        Professor Narongsak Chaiyabutr, Ph.D.  
Thesis Co-Advisor    Professor Bungorn Chomdej, Ph.D.

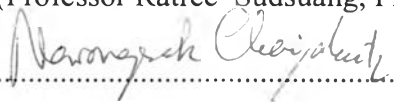
---

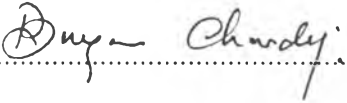
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Doctor of Philosophy.

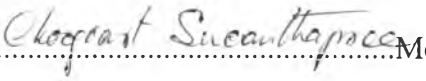
  
.....Dean of Graduate School  
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)


Thesis Committee

  
.....Chairman  
(Professor Ratre Sudsuang, Ph.D.)

  
.....Thesis Advisor  
(Professor Narongsak Chaiyabutr, Ph.D.)

  
.....Thesis Co-Advisor  
(Professor Bungorn Chomdej, Ph.D.)

  
.....Member  
(Assistant Professor Choogart Sucanthapree, Ph.D.)

  
.....Outside-Member  
(Professor Thirayudh Glinsukon, Sc.D.)

ธมลวรรณ ส่วนอรุณสวัสดิ์ : กลไกการออกฤทธิ์ของสตีวียอไซด์ต่อสรีรวิทยาของไตในหนูแรท. อาจารย์ที่ปรึกษา : ศ. ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศ.ดร.บงอร ชมเดช. 204 หน้า, ISBN 974-636-604-1

การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารหวานสตีวียอไซด์ต่อการทำหน้าที่ของไตในหนูแรท การให้สตีวียอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในปริมาณที่ต่างกันตั้งแต่ขนาดต่ำ, ปานกลางและขนาดสูง (100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) จะลดความดันเลือดลงสู่ระดับต่ำสุดได้ภายใน 5-7 นาที หลังจากนั้นความดันเลือดจะค่อยๆเพิ่มขึ้นแต่ก็ยังไม่ถึงค่าระดับปกติในขณะที่อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นตลอดในหนูแรทที่ได้รับสตีวียอไซด์ในขนาดสูงและปานกลาง ความดันเลือดที่ลดต่ำสุดโดยสตีวียอไซด์จะไม่เกิดถ้าหนูแรทได้รับสารL-NAMEก่อนให้สตีวียอไซด์ ส่วนความดันเลือดที่ยังต่ำรวมทั้งอัตราเต้นของหัวใจที่เพิ่มขึ้นในช่วงหลังจะไม่เกิดถ้าหนูได้รับสารอินโดเมธิทาสีนก่อนให้สตีวียอไซด์ หนูที่ได้รับสารพาราไซซินก่อนให้สตีวียอไซด์ความดันเลือดจะลดลงทั้งช่วงก่อนและหลังจากให้สตีวียอไซด์ในขณะที่เมื่อให้สารนอร์อิพิเนฟรินจะให้ผลตรงข้ามกับพาราไซซิน ปริมาณเลือดและพลาสมาไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากการให้สตีวียอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำ การให้สตีวียอไซด์โดยการกินในปริมาณ 2 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยแบ่งให้ 2 ครั้งห่างกัน 45 นาที พบว่าสามารถลดความดันเลือดได้เช่นเดียวกันแต่ให้ผลน้อยกว่าการให้ทางหลอดเลือดดำ ในช่วงเวลา 30 นาทีแรกของการให้สตีวียอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำพบว่าอัตราไหลของเลือดผ่านไตเพิ่มขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอัตราการกรองที่ไต หลังจากนั้นอัตราการไหลของเลือดผ่านไตจะไม่เปลี่ยนแปลงในขณะที่อัตราการกรองจะลดลงเมื่อหยุดให้สตีวียอไซด์ในหนูกลุ่มที่ได้รับสตีวียอไซด์ปริมาณสูงและปานกลาง การให้สตีวียอไซด์โดยการกินไม่มีผลต่อทั้งอัตราการไหลของเลือดผ่านไตและอัตราการกรอง การเพิ่มของอัตราการไหลของเลือดผ่านไตจะไม่เกิดในหนูที่ได้รับอินโดเมธิทาสีนหรืออาร์จินีนเวสเพรสซินก่อนการให้สตีวียอไซด์ จากการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาพบว่ามีการบวมของหลอดเลือดฝอยไกลเมอรูลัสของหนูที่ได้รับสตีวียอไซด์ในปริมาณสูงและปานกลาง

สัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์, กลูโคส, และโปแตสเซียม ทางปัสสาวะจะเพิ่มขึ้นทั้งในช่วงที่ให้และหยุดให้สตีวียอไซด์ทางหลอดเลือดดำ จากการศึกษาดังกล่าวโดยวิธีลิเธียมเคลียแรนซ์ จะพบว่ามีผลการดูดกลับของโซเดียมและน้ำที่หลอดเลือดฝอยไตส่วนต้นซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม ใน30นาทีแรกของการให้สตีวียอไซด์ทางหลอดเลือดดำ จะลดการทำงานของไมโทคอนเดรีย และเอ็นไซม์โซเดียม-โปแตสเซียม เอทีพีเอสที่ไตได้ 14 % และ21 % ตามลำดับขณะที่ระดับการลดการดูดกลับของโซเดียมสูงถึง 88 % การเพิ่มของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียมและคลอไรด์ยังคงระดับสูง ไม่ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่เปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลของเลือดและอัตราการกรองที่ไต พบว่าในหนูที่ได้รับอินโดเมธิทาสีนหรืออาร์จินีนเวสเพรสซินก่อนให้สตีวียอไซด์ จะป้องกันไม่ให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์ และโปแตสเซียมได้ในช่วง 30 นาทีหลังของการให้สตีวียอไซด์ การให้สตีวียอไซด์โดยการกินก็มีผลเพิ่มสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์ และโปแตสเซียม แต่สัดส่วนการขับทิ้งของกลูโคสไม่เปลี่ยนแปลง การให้สตีวียอไซด์ทางหลอดเลือดดำจะเพิ่มระดับกลูโคสในพลาสมา แต่ระดับกลูโคสที่สูงขึ้นนี้ยังต่ำกว่าระดับของกลูโคสในเลือดที่เริ่มทำให้มีการขับกลูโคสออกทางปัสสาวะ (264±19.25 มิลลิกรัม%) นอกจากนี้อัตราการดูดกลับกลูโคสที่ไตในช่วงที่ให้สตีวียอไซด์ยังต่ำกว่าค่าอัตราเร็วสูงสุดการดูดกลับของกลูโคสที่ไต สตีวียอไซด์เพิ่มระดับกลูโคสในพลาสมาโดยการลดการเคลื่อนที่ของกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยไม่มีผลใดๆต่อระดับอินซูลินในพลาสมา การให้ แอล-เนม หรือพาราไซซิน หรืออินโดเมธิทาสีนก่อนให้สตีวียอไซด์จะลดระดับกลูโคสที่สูงนี้ได้ แต่ระดับกลูโคสก็ยังไม่เข้าสู่ภาวะปกติ ยกเว้นถ้าให้ แอล-เนม ร่วมกับอินโดเมธิทาสีนก่อนให้สตีวียอไซด์ จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า การลดความดันเลือดเมื่อให้สตีวียอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำนั้นเป็นผลมาจากผ่านการหลังในไตรกออกไซด์, โปรสตาแกรนดินและการทำงานของระบบซิมพาเทติก สตีวียอไซด์จะทำให้หลอดเลือดทั้งหลอดเลือดแอฟเฟอเรนซ์ และอีฟเฟอเรนซ์ของไตขยาย การเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์, กลูโคส, และโปแตสเซียมเป็นผลจากการลดการดูดกลับของโซเดียมที่หลอดเลือดไตส่วนต้น ซึ่งต่างจากการให้สตีวียอไซด์โดยการกินซึ่งจะมีผลที่ปล่อยไตส่วนปลายมากกว่าส่วนต้น การเพิ่มขึ้นของกลูโคสในพลาสมาโดยผลของสารสตีวียอไซด์ คงจะเป็นผลจากปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์, โปรสตาแกรนดินและระบบซิมพาเทติก นอกจากนี้สตีวียอไซด์ยังยับยั้งภาวะที่กลูโคสในพลาสมาสูงกระตุ้นการหลั่งอินซูลินด้วย

ภาควิชา .....

สาขาวิชา ..... (ศ.ดร.ณรงค์ศักดิ์)

ปีการศึกษา ..... ๒๕๓๙ .....

ลายมือชื่อนิติต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... 2๐๐๗ .....

## C 547062 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD : STEVIOSIDE / RENAL FUNCTION/RAT/ GLUCOSE METABOLISM

THAMOLWAN SUANARUNSAWAT : THE MECHANISM OF ACTION OF STEVIOSIDE ON RENAL FUNCTION IN RAT. THESIS ADVISOR : PROF. NARONGSAK CHAIYABUTR, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : PROF. BUNGORN CHOMDEJ, Ph.D. 204 pp. ISBN 974-636-604-1

This research has been performed to elucidate the effect and the mechanism of action of stevioside (SVS) on the renal function in rats. An intravenous infusion of SVS (150 mg/ml) in the small, medium and large doses (100,150,200 mg/kg.BW) reduced blood pressure to the lowest values in the dose-dependent manner within 5-7 min. ( $P < 0.001$ ). Blood pressure gradually increased afterward but not to the normal level while heart rate continuously increased in rats treated with the large and medium doses of SVS infusion. The initial decrease of blood pressure could be reversed after pretreated with L-NAME whereas both hypotension and tachycardia in the latter period was reversed by pretreatment with indomethacin. Animals pretreated with prazosin reduced blood pressure and heart rate ( $P < 0.001$ ) both before and during SVS infusion while pretreatment with norepinephrine showed the opposite results. The plasma volume and blood volume were not significantly affected during SVS infusion. SVS intubation (2 g/kg.BW) for 6 hours also induced hypotension but with a slight extent. The first 30-min of SVS infusion raised ERBF ( $P < 0.05$ ) without a change of GFR. ERBF was unaltered afterward while GFR reduced ( $P < 0.05$ ) after cessation of SVS infusion in animals treated with the large and medium doses. SVS feeding had no effect on renal hemodynamics. Renal vasodilatation action by SVS infusion could be reversed in rats pretreated with indomethacin or arginine vasopressin (AVP). The congestion of glomerular capillaries from histopathological examination was noted in animals treated with the large and medium doses.

The fractional excretion of  $\text{Na}^+$  ( $\text{FE}_{\text{Na}}$ ),  $\text{Cl}^-$  ( $\text{FE}_{\text{Cl}}$ ), glucose ( $\text{FE}_{\text{G}}$ ) and  $\text{K}^+$  ( $\text{FE}_{\text{K}}$ ) was significantly raised in both during and after SVS infusion. The lithium clearance method showed that the depression of proximal tubular  $\text{Na}^+$  and water reabsorption correlated to the elevation of  $\text{FE}_{\text{Na}}$ . The first 30-min of SVS infusion suppressed the renal mitochondrial activity and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase activity ( $P < 0.05$ ) approximately 14% and 21% respectively while proximal tubular reabsorption of  $\text{Na}^+$  reduced 88%. The rise of  $\text{FE}_{\text{Na}}$  and  $\text{FE}_{\text{Cl}}$  remained no matter how a change of renal hemodynamics was occurred or not. Pretreatment with indomethacin or AVP reversed the rise of electrolyte excretion during the second period of SVS infusion. SVS intubation also increased electrolyte excretion ( $P < 0.05$ ) without a change of  $\text{FE}_{\text{G}}$ . SVS infusion raised the plasma glucose level ( $P_{\text{G}}$ ) ( $P < 0.001$ ) but  $P_{\text{G}}$  was still lower than the renal plasma threshold of glucose in normal rats ( $264 \pm 19.25$  mg%). Moreover renal tubular reabsorption of glucose during SVS infusion was lower than the tubular transport maximum of glucose ( $\text{Tm}_{\text{G}}$ ). SVS infusion raised  $P_{\text{G}}$  by decrease in glucose uptake without a change in insulin release. Hyperglycemic effect of SVS infusion was attenuated after pretreatment with L-NAME or prazosin or indomethacin, but returned to normal after pretreatment with a combination of L-NAME and indomethacin. It can be concluded that the hypotension and tachycardia were mediated via NO, prostaglandin and sympathetic activity during SVS infusion. SVS infusion caused a dilation of both afferent and efferent arterioles. An increase in electrolyte and glucose excretion induced by SVS infusion was the reduction of proximal tubular reabsorption of  $\text{Na}^+$  whereas SVS intubation exerted its effect on distal part of nephron. The hyperglycemic effect by the action of SVS infusion was the interaction among NO, prostaglandin and sympathetic activity. SVS infusion also inhibited glucose-stimulated insulin release.

ภาควิชา.....

สาขาวิชา..... สอน..... วิชา.....

ปีการศึกษา..... 2539.....

ลายมือชื่อนิติ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Narongsak Chaiyabutr

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... Bungsorn Chomdej

## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to my advisor, Professor Dr.Narongsak Chaiyabutr, and my Co-advisor, Professor Dr.Bungorn Chomdej for their kind advice, guidance, frank, keen interest and constant encouragement that bring me to succeed my study.

My sincere and warm application is also express to Associate Professor Dr. Achariya Sailasute for her kind suggestion to perform histopathological examination of kidney tissues.

My thanks would also express to Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for the provision and the facilities used in experimental works and laboratory technique.

I am also indebted to all experimental rats for their sacrifice which bring me to succeed in my study.

I would like to thank the committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

In addition, I also indebted to the members of the advisory committee who have given much help over the problems discussed, and to all staffs of the Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, for their very good suggestions. I would like to thank Miss Hathaithip Parkinsee for her excellent typing.

Finally, this thesis is dedicated to my parent for their encouragement and constant support throughout my study.

## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	IV
ENGLISH ABSTRACT.....	V
ACKNOWLEDGEMENT.....	VI
CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	XI
LIST OF FIGURES.....	XIV
GLOSSARY OF SYMBOLES.....	XVIII
SUMMARY.....	XXI
CHAPTER	
I. GENERAL INTRODUCTION.....	1
II. BACKGROUND INFORMATION.....	6
Stevioside (SVS).....	6
1. Chemical and physical properties.....	7
2. Absorption,distribution,metabolism and excretion.....	9
3. Safety and Toxicity of SVS and Stevia extract.....	9
4. Biological and pharmacological effect of SVS .....	12
Renal tubular handling of substances .....	18
1. Renal tubular handling of Na <sup>+</sup> and Cl.....	18
1.1 Lithium clearance (C <sub>Li</sub> ) .....	18
1.2 Renal regulation of Na <sup>+</sup> reabsorption.....	23

	Page
1.2.1 Glomerulotubular balance.....	23
1.2.2 Renal enzyme $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPase.....	24
1.2.3 Renal mitochondrial function.....	25
1.2.4 Angiotensin II ( $\text{A}_{II}$ ).....	29
1.2.5 Aldosterone.....	31
1.2.6 Sympathetic control.....	32
1.2.7 Arginine vasopressin (AVP).....	33
1.2.8 Prostaglandin.....	34
1.2.9 Nitric oxide.....	36
2. Renal tubular handling of $\text{K}^+$ .....	39
3. Renal tubular handling of glucose.....	40
III. MATERIALS AND METHODS.....	42
1. Animal preparation.....	42
2. Experimental procedures.....	42
2.1 Determination the effect of SVS on renal function.....	42
2.2 Histopathological study of renal tissue.....	44
2.3 Determination of site and mechanism of.....	45
natriuretic effect of SVS	
2.3.1 Lithium clearance ( $\text{C}_{\text{Li}}$ ) .....	45
2.3.2 Determination of renal $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPase activity.....	46
2.3.3 Determination of renal mitochondrial activity.....	47
2.4 Measurement of plasma volume and blood volume.....	50



	Page
2.5 Determination of renal plasma threshold and tubular transport maximum of glucose ( $T_{mG}$ )	51
2.6 Determination of glucose turnover rate (GTR)	51
2.7 Determination the actions of SVS administration is mediated via norepinephrine, angiotensin II arginine vasopressin, nitric oxide, prostaglandin, prazosin or atropine	53
3. Analytical determinations	54
4. Calculations	55
5. Statistics	57
IV. EFFECT OF STEVIOSIDE ON RENAL FUNCTION	58
Introduction	58
Materials and methods	58
Statistics	60
Results	60
Discussion	82
V. THE EFFECT OF INTRAVENOUS INFUSION OF STEVIOSIDE ON THE URINARY SODIUM EXCRETION	90
Introduction	90
Materials and methods	91
Experimental procedures	91
Statistics	94

	Page
Results.....	94
Discussion.....	100
VI. THE EFFECT OF STEVIOSIDE ON GLUCOSE.....	108
METABOLISM AND RENAL GLUCOSE HANDLING	
Introduction.....	108
Materials and methods.....	109
Statistical analysis.....	114
Results.....	115
Discussion.....	123
VII RENAL FUNCTION FOLLOWING STEVIOSIDE INFUSION.....	133
IN RATS TREATED WITH $\alpha$ -ADRENERGIC BLOCKER, NITRICOXIDE SYNTHESIS INHIBITOR, PROSTAGLANDIN SYNTHESIS INHIBITOR AND CHOLINERGIC BLOCKER	
Introduction.....	133
Materials and methods.....	134
Results.....	136
Discussion.....	146
GENERAL DISCUSSION.....	159
BIBLIOGRAPHY.....	174
APPENDIX.....	203
BIOGRAPHY .....	204

## LIST OF TABLES

		Page
Table 4.1	Changes of renal hemodynamics in response to SVS infusion.....	64
Table 4.2	The alterations of urine flow (V) and fractional excretion..... of urine (V/GFR)	67
Table 4.3	Effect of SVS infusion on plasma electrolytes.....	69
Table 4.4	The urinary excretion of electrolytes in response to SVS infusion...	70
Table 4.5	The alterations of ..... fractional excretion of electrolytes in response to SVS infusion	72
Table 4.6	The effect of SVS infusion on plasma osmolality ..... (Posm), osmolar clearance (Cosm) and free water clearance (CH <sub>2</sub> O)	74
Table 4.7	Alteration of general ..... circulation and renal function after 6 hours of SVS intubation	76
Table 5.1	The effects of SVS infusion on ..... lithium clearance as a marker of proximal tubular Na <sup>+</sup> reabsorption	95
Table 5.2	Effect of SVS infusion on renal Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPase activity.....	101
Table 5.3	Changes of renal mitochondrial ..... activity comparing between control and SVS infusion group	102
Table 6.1	Effect of SVS infusion on plasma glucose (P <sub>G</sub> ), urinary..... glucose excretion (U <sub>G</sub> V) and fractional glucose excretion (FE <sub>G</sub> )	116
Table 6.2	Glucose turnover rate ..... (GTR) in rats subjected to normal saline (control) and SVS infusion.	119

	Page
Table 6.3	120
Effect of SVS infusion on plasma glucose ( $P_G$ ) in rats.....	
with or without prazosin, angiotensin II ( $A_{II}$ ), arginine vasopressin	
(AVP),L-NAME,indomethacin,L-NAME+indomethacin and insulin	
Table 6.4	124
Tubular transport maximum of glucose ( $Tm_G$ ) in normal rat.....	
loaded with intravenous infusion of various concentration of glucose	
Table 6.5	124
The alteration of tubular reabsorption of glucose (mg/min).....	
in rat before, during and after 200 mg/kg.BW of SVS infusion	
Table 7.1	144
Change in renal hemodynamics and urine flow rate in.....	
response to SVS infusion alone and during pretreated with norepi-	
nephrine (NE), angiotensin II ( $A_{II}$ ), arginine vasopressin (AVP) L-	
NAME,indomethacin (INDO),L-NAME+indomethacin and atropine	
Table 7.2	147
The alterations of plasma electrolytes in rats subjected with.....	
SVS infusion alone and during pretreated with norepinephrine(NE),	
angiotensin II ( $A_{II}$ ), arginine vasopressin (AVP), L-NAME,	
indomethacin (INDO), L-NAME+indomethacin and atropine	
Table 7.3	148
Fractional urinary excretion of.....	
sodium ( $Na^+$ ), potassium ( $K^+$ ) and chloride ( $Cl^-$ )s in rats subjected	
with SVS infusion alone and pretreated with norepinephrine (NE),	
angiotensin II ( $A_{II}$ ), arginine vasopressin (AVP), L-NAME,	
indomethacin (INDO), L-NAME+indomethacin and atropine	
Table 7.4	150
Effect of SVS infusion on fractional.....	
excretion of glucose (FE) in rats with or without pretreated with	

norepinephrine (NE), angiotensin II ( $A_{II}$ ), arginine vasopressin (AVP), L-NAME, indomethacin (INDO), L-NAME+indomethacin and atropine

## LIST OF FIGURES

		page
Figure 2.1	The chemical structure of stevioside.....	8
Figure 2.2	Diagram showing a nephron ..... with its different segments for water, Na <sup>+</sup> , and lithium. The percentages of the filtered load which is delivered from the proximal tubules to the loop of Henle and urine are indicated.	21
Figure 2.3	Schematic representation of the event..... in mitochondrial respiratory chain (upper panel) and mechanisms of mitochondrial ATP synthesis (lower panel)	28
Figure 2.4	Synthesis of nitric oxide (NO)..... from arginine and its action via guanylate cyclase to increase intracellular cyclic GMP (cGMP). The synthesis requires NADPH, Thiol, tetrahydrobiopterin, FAD, and FMN as cofactors.	37
Figure 3.1	Diagram represents the method..... to separate renal Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> ATPase enzyme.	48
Figure 4.1	The alteration of mean arterial..... pressure (MAP) in response to SVS infusion.	62
Figure 4.2	The alteration of heart rate in response to SVS infusion.....	62
Figure 4.3	Percent change of effective renal blood flow (ERBF)(A)and..... glomerular filtration rate (GFR) (B) during and after SVS infusion	65
Figure 4.4	Percent changes of fractional excretion.....	73

	Page
	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> and Cl <sup>-</sup> in rat treated with SVS infusion at the dose of 200,150, and 100 mg/kg BW.
Figure 4.5	77
	Light micrograph of renal tissue..... of rat given normal saline illustrating the normal appearance.
Figure 4.6	78
	Picture under light microscope..... of renal tissue of rat treated with SVS infusion (200 mg/kg.BW)
Figure 4.7	79
	Light micrographs of renal tissue..... of rat treated with SVS infusion (150 mg/kg.BW)
Figure 4.8	80
	The picture under light microscope..... of rat subjected to SVS infusion (100 mg/kg.BW)
Figure 4.9	81
	The alteration of plasma volume..... (PV) and blood volume (BV) in control and SVS infusion group
Figure 5.1	96
	The relationship between FE <sub>Na</sub> ..... versus FE <sub>Li</sub> (A), and proximal Na <sup>+</sup> reabsorption versus FE <sub>Na prox</sub> (B)
Figure 5.2	97
	The alteration of proximal ..... reabsorption of Na <sup>+</sup> and H <sub>2</sub> O, FE <sub>Li</sub> , FE <sub>Na</sub> , renal Na <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> ATPase and renal mitochondrial activity in response to SVS infusion
Figure 6.1	120
	Alterations of plasma glucose (P <sub>G</sub> ) ..... and urinary glucose excretion (U <sub>G</sub> V) in rats given of SVS feeding.
Figure 6.2	121
	Percent changes of plasma ..... glucose level during drugs pretreatment and SVS infusion.
Figure 6.3	125
	The relationship between plasma glucose.....

	Page
	(P <sub>G</sub> ) and urinary glucose excretion (U <sub>G</sub> V) after glucose loading
Figure 7.1	138
	Changes of mean arterial pressure (MAP) in rats given..... of SVS alone and pretreated with norepinephrine (NE), angiotensin II(A <sub>II</sub> ),arginine vasopressin(AVP),L-NAME, indomethacin (INDO) and L-NAME+indomethacin (L-NAME+INDO) and atropine.
Figure 7.2	139
	Changes of heart rate (HR) in rats treated with SVS alone..... pretreated with norepinephrine (NE), prazosin, angiotensin II (A <sub>II</sub> ), arginine vasopressin (AVP), atropine, L-NAME, indomethacin (INDO) and L-NAME+indomethacin (L-NAME+INDO).
Figure 7.3	145
	Percent changes of effective renal blood flow (ERBF) and..... glomerular filtration rate (GFR) in rats given of SVS alone and pretreated with norepinephrine (NE), angiotensin II (A <sub>II</sub> ), arginine vasopressin (AVP),L-NAME, indomethacin (INDO) and L- NAME+indomethacin (L-NAME+INDO) and atropine.
Figure 7.4	149
	Percent changes of fractional excretion of ..... Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> and Cl <sup>-</sup> in rats given of SVS alone and pretreated with norepinephrine (NE), angiotensin II (A <sub>II</sub> ), arginine vasopressin (AVP) ,L-NAME, indomethacin (INDO) and L-NAME+ indomethacin (L-NAME+INDO) and atropine.
Figure 7.5	151
	Percent changes of fractional excretion of glucose <sup>-</sup> in response to... SVS alone and pretreated with norepinephrine (NE),angiotensin II (A <sub>II</sub> ), arginine vasopressin (AVP) ,L-NAME, indomethacin (INDO)



	Page
	and L-NAME+indomethacin (L-NAME+INDO) and atropine.
Figure 8.1	172
	Schematic represents the ..... proposed mechanisms of action of SVS infusion on renal function
Figure 8.2	173
	Schematic represents..... the action of SVS intubation on renal function

## GLOSSARY OF SYMBOLS

SVS	=	Stevioside
MAP	=	Mean arterial pressure
HR	=	Heart rate
GFR	=	Glomerular filtration rate
ERPF	=	Effective renal plasma flow
ERBF	=	Effective renal blood flow
FF	=	Filtration fraction
V	=	Urine flow rate
$P_{Na}, P_K, P_{Cl}, P_G$	=	Plasma concentration of $Na^+$ , $K^+$ , $Cl^-$ and glucose respectively
$U_{Na}V, U_KV, U_{Cl}V$	=	Urinary excretion of $Na^+$ , $K^+$ , and $Cl^-$ respectively
$FE_{Na}, FE_K, FE_{Cl}$	=	Fractional excretion of $Na^+$ , $K^+$ , and $Cl^-$ respectively
Cosm	=	Osmolar clearance
$C_{H_2O}$	=	Free water clearance
Posm	=	Plasma osmolality
$C_{Li}$	=	Lithium clearance
$Na^+, K^+ \text{ ATPase}$	=	Sodium-potassium adenosine triphosphatase
$C_{Na}$	=	Sodium clearance
NSS	=	Normal saline
GTR	=	Glucose turnover rate

$Tm_G$	=	Transport maximum of glucose
$A_{II}$	=	Angiotensin II
NE	=	Norepinephrine
AVP	=	Arginine vasopressin
L-NAME	=	L- $\omega$ - nitro-L-arginine methyl ester
INDO	=	Indomethacin
NO	=	nitric oxide
$FE_{Na_{prox}}$	=	Fractional excretion of sodium at proximal tubule
$C_{In}$	=	Inulin clearance
$FE_{Li}$	=	Fractional excretion of lithium
RCR	=	Respiratory control ratio
P/O	=	Ratio of ADP added to total $O_2$ uptake during state 3 respiration
St 3	=	Mitochondrial state 3 respiration
St 4	=	Mitochondrial state 4 respiration
iv	=	intravenous
ip	=	intraperitoneal
kg.BW	=	Kilobodyweight
$\mu g$	=	microgram
mg	=	miligram
L	=	Litre
ml	=	mililitre
min	=	minute

w/v	=	weight by volume
$\mu\text{mol}$	=	micromole
nmol	=	nanomole
mmol	=	milimole
$\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPase}$	=	Sodium-potassium adenosine triphosphate
PGOT	=	Plasma glutamic-oxaloacetic transaminase
PGPT	=	Plasma glutamic-pyruvic transaminase

## SUMMARY

This thesis describes studies on the effect of SVS on the renal function in rat. The review of the literature in the first part of thesis dealing with general aspects of the action of SVS on renal function, general circulation and the plasma glucose level.

The initial experiment was designed to study the effect of SVS on the general circulation and the renal function (chapter IV). It was shown that SVS either infusion or intubation produced the reduction of blood pressure to the lowest level in dose and time dependent manner. The initial reduction of blood pressure was apparent at 5-7 min after SVS infusion of the large (200 mg/kg.BW) and medium doses (150 mg/kg.BW), and then gradually increased afterward but not returned to normal level despite a cessation of SVS infusion. The heart rate continuously increased in corresponding to the hypotension. The reduction of blood pressure during SVS infusion was found to be due to the vasodilatation not to the decline of the plasma volume. The experiment using animals pretreated with various drugs (chapter VII) demonstrated that the initial reduction of blood pressure was mediated via the action of nitric oxide (NO). The recovery of blood pressure was not accomplished. To compensate the hypotension, sympathetic stimulation is operated. The action of prostaglandin to overcome the sympathetic activity and the release of prostaglandin by the direct action from SVS infusion or sympathetic activation are discussed.

Animal intubation on SVS induced hypotension but it had no significant effect on renal hemodynamics (chapter IV). SVS infusion produced not only hypotension

but also raised effective renal blood flow (ERBF) in the first period of SVS infusion. This indicates its vasodilator effect on renal vasculature. Despite the elevation of ERBF, GFR was not changed, suggesting the vasodilatation in both afferent and efferent arterioles. Animal pretreated with arginine vasopressin (AVP) or indomethacin reversed the rise of ERBF (chapter VII). The reversibility of ERBF after pretreated with AVP should not be due to the inhibitory action of SVS infusion on AVP action or release since AVP itself had no significant effect on renal hemodynamics. It would rather be that AVP inhibits SVS-induced prostaglandin liberation or action on renal vasculature. The action of SVS infusion on renal vasodilatation was suspected to be mediated via prostaglandin system.

After the first period of SVS infusion, no significant alteration of renal hemodynamics except the reduction of GFR was apparent after cessation of administration of the large and medium doses of SVS infusion. The congestion of glomerular capillaries was shown from histopathological examination of renal tissues of animals treated with both doses of SVS infusion. These changes would account for the reduction of GFR in both groups. The urine flow rate markedly increased during the first period of SVS infusion and in animals fed with SVS (chapter IV). The elevations of  $FE_{Na}$ ,  $FE_{Cl}$  and  $FE_K$  were noted. These changes would be due to the depression of renal tubular reabsorption of electrolytes since GFR and plasma electrolyte did not alter.

These results encouraged further experiments to elucidate the site of renal tubule responsible for the natriuretic during SVS infusion. The site of its natriuretic

action was elucidated using the lithium clearance ( $C_{Li}$ ) technique. The rise of  $Na^+$  and  $Cl^-$  excretion was shown to be related to the reduction of proximal tubular reabsorption of  $Na^+$  and  $Cl^-$  in both during and after SVS infusion, suggesting the site of action of SVS infusion to produce natriuresis. This assumption was also confirmed by the elevation of urinary glucose excretion (chapter VI). The enhancement of electrolyte excretion after SVS intubation was not due to the reduction of the proximal tubular reabsorption of  $Na^+$  since  $FE_G$  was still normal.

The mechanism of natriuretic effect of SVS infusion was also carried out by the determination of renal  $Na, K^+$  ATPase and mitochondrial function (chapter V). Renal  $Na, K^+$  ATPase and mitochondrial function were suppressed during the first period of SVS infusion. The extent of these alterations was only 14-20% whereas the reduction of proximal tubular reabsorption of  $Na^+$  and  $H_2O$  markedly increased approximately 88%. The change of starting forces at peritubular capillary was unlikely to be the cause since the increase of electrolyte excretion was remained in spite of the absence change of renal hemodynamics. By using various drugs for pretreatment to the animals did not show any effect on the action of SVS-induced electrolyte excretion except the pretreatment with AVP and indomethacin (chapter VII). The recovery of electrolyte excretion produced by the pretreatment of AVP or indomethacin was not due to their effect to inhibit proximal tubular action of SVS infusion. The action of SVS infusion itself was the predominant cause of the rise of electrolyte excretion. The destruction of proximal tubular cell was also demonstrated from histopathological examination after SVS infusion (chapter IV)

The profound urinary glucose excretion was found in animals subjected to SVS infusion but not in SVS intubation (chapter VI). Glucosuria was still apparent despite stopping SVS infusion. This might be attributed to the rise of the plasma glucose level which might be higher than the renal plasma threshold of glucose during SVS infusion. From the study of the glucose turnover rate, the rise of plasma glucose level was not due to the reduction of insulin release, but rather due to the reduction of glucose uptake (Chapter VI). Animals pretreated with prazosin or L-NAME or indomethacin could attenuate the hyperglycemic response to SVS infusion during the second period, indicating the participation of sympathetic activity, NO and prostaglandin in hyperglycemic effect of SVS infusion. The plasma glucose level seems to return back to normal level in animal pretreated with the combination of L-NAME and indomethacin. These results suggest some interactions occurred among these drugs to induce hyperglycemia during SVS infusion. The hyperglycemic response was remained despite stopping SVS infusion in group of animals treated with the large and medium doses. Although SVS infusion produced the rise of plasma glucose level, this does not account for the glucosuria since the renal plasma threshold of glucose was higher than the hyperglycemic level induced by SVS infusion. Renal tubular reabsorption of glucose during SVS infusion was much less than tubular transport maximum of glucose ( $Tm_G$ ). It was clearly shown that the glucosuric response to both during and after SVS infusion is primary due to the suppression of proximal tubular  $Na^+$  reabsorption since there was the close relationship between  $FE_G$  and  $FE_{Na}$ . Despite the elevation of plasma glucose level during SVS infusion, insulin-released in response to hyperglycemia was not apparent (chapter VI), indicating that



SVS infusion impaires glucose-stimulated insulin release. However, tissue response to insulin is still intact.

Finally, the results of all these experiments are discussed in general term. The proposed mechanism of actions of SVS either infusion or intubation is presented.