กลไกการออกฤทธิ์ของสติวิโอไซด์ต่อสรีรวิทยาของไตในหนูแรท

นางสาวธมลวรรณ ส่วนอรุณสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สหสาขาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-604-1

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 Ratree Sudsuang, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Professor Narongsak Chaiyabutr, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Professor Bungorn Chomdej, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Choogiart Sucanthapree, Ph.D.)

.....Outside-Member

(Professor Thirayudh Glinsukon, Sc.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

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

การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารหวานสติวิโอไซด์ต่อการทำหน้าที่ของไตในหนูแรท การให้สติวิโอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในปริมาณที่ต่างกันตั้งแต่ขนาดต่ำ,ปานกลางและขนาดสูง (100,150 และ 200 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) จะลดความดันเลือดลงสู่ระดับต่ำสุดได้ภายใน 5-7 นาที หลังจากนั้นความดันเลือดจะค่อยๆเพิ่มขึ้นแต่ก็ยังต่ำกว่าระดับปกติในขณะที่อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นตลอดในหนูแรทที่ได้รับสติวิโอไซด์ในขนาดสูงและปานกลาง ความดันเลือดที่ลดต่ำสุดโดยสติวิโอไซด์จะไม่เกิดถ้าหนูแรทได้รับสารL-NAMEก่อนให้สติวิโอไซด์ ส่วนความดันเลือดที่ยังต่ำรวมทั้งอัตราเต้นของหัวใจที่เพิ่มขึ้นในช่วงหลังจะไม่เกิดถ้าหนูได้รับสารอินโดเม็ทธาซินก่อนให้สติวิโอไซด์ หนูที่ได้รับสารพราโซซินก่อนให้สติวิโอไซด์ความดันเลือดจะลดลงทั้งช่วงก่อนและหลังจากให้สติวิโอไซด์ในขณะที่เมื่อให้สารนอร์อิพิเนฟรินจะให้ผลตรงข้ามกับพราโซซิน ปริมาณเลือดและพลาสมาไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากการให้สติวิโอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำ การให้สติวิโอไซด์โดยการกินในปริมาณ 2 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยแบ่งให้ 2 ครั้งห่างกัน 45 นาที พบว่าสามารถลดความดันเลือดได้เช่นเดียวกันแต่ให้ผลน้อยกว่าการให้ทางหลอดเลือดดำ ในช่วงเวลา 30 นาทีแรกของการให้สติวิโอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำพบว่าอัตราไหลของเลือดผ่านไตเพิ่มขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอัตราการกรองที่ไต หลังจากนั้นอัตราการไหลของเลือดผ่านไตจะไม่เปลี่ยนแปลงในขณะที่อัตราการกรองจะลดลงเมื่อหยุดให้สติวิโอไซด์ในหนูกลุ่มที่ได้รับสติวิโอไซด์ปริมาณสูงและปานกลาง การให้สติวิโอไซด์โดยการกินไม่มีผลต่อทั้งอัตราการไหลของเลือดผ่านไตและอัตราการกรอง การเพิ่มของอัตราการไหลของเลือดผ่านไตจะไม่เกิดในหนูที่ได้รับอินโดเม็ทธาซินหรืออาร์จินีนเวโสเพรสซินก่อนการให้สติวิโอไซด์ จากการตรวจชิ้นเนื้อไตทางพยาธิวิทยาพบว่ามีการบวมของหลอดเลือดฝอยโกลเมอรูลัสของหนูที่ได้รับสติวิโอไซด์ในปริมาณสูงและปานกลาง

สัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์ ,กลูโคส, และโปแตสเซียม ทางปัสสาวะจะเพิ่มขึ้นทั้งในช่วงที่ให้และหยุดให้สติวิโอไซด์ทางหลอดเลือดดำ จากการศึกษาโดยวิธีลิเธียมเคลียแรนซ์ จะพบว่ามีการลดการดูดกลับของโซเดียมและน้ำที่หลอดฝอยไตส่วนต้นซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม ใน30นาทีแรกของการให้สติวิโอไซด์ทางหลอดเลือดดำจะลดการทำงานของไมโตคอนเดรีย และเอ็นไซม์โซเดียม-โปแตสเซียม เอทีพีเอสที่ไตได้ 14 % และ21 % ตามลำดับขณะที่ระดับการลดการดูดกลับของโซเดียมสูงถึง 88 % การเพิ่มของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียมและคลอไรด์ยังคงระดับสูง ไม่ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่เปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลของเลือดและอัตราการกรองที่ไต พบว่าในหนูที่ได้รับอินโดเม็ทธาซินหรืออาร์จินีนเวโสเพรสซินก่อนให้สติวิโอไซด์ จะป้องกันไม่ให้มีการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์ และโปแตสเซียมได้ในช่วง 30 นาทีหลังของการให้สติวิโอไซด์ การให้สติวิโอไซด์โดยการกินก็มีผลเพิ่มสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์ และโปแตสเซียม แต่สัดส่วนการขับทิ้งของกลูโคสไม่เปลี่ยนแปลง การให้สติวิโอไซด์ทางหลอดเลือดดำจะเพิ่มระดับกลูโคสในพลาสมา แต่ระดับกลูโคสที่สูงขึ้นนี้ยังต่ำกว่าระดับของกลูโคสในเลือดที่เริ่มทำให้มีการขับกลูโคสออกทางปัสสาวะ (264±19.25 มิลลิกรัม%) นอกจากนั้นอัตราการดูดกลับกลูโคสที่ไตในช่วงที่ให้สติวิโอไซด์ยังต่ำกว่าค่าอัตราเร็วสูงสุดการดูดกลับของกลูโคสที่ไต สติวิโอไซด์เพิ่มระดับกลูโคสในพลาสมาโดยการลดการเคลื่อนที่ของกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยไม่มีผลใดๆต่อระดับอินซูลินในพลาสมา การให้ แอล-เนม หรือพราโซซิน หรืออินโดเม็ทธาซินก่อนให้สติวิโอไซด์จะลดระดับกลูโคสที่สูงนี้ได้ แต่ระดับกลูโคสก็ยังไม่เข้าสู่ภาวะปกติ ยกเว้นถ้าให้ แอล-เนม ร่วมกับอินโดเม็ทธาซินก่อนให้สติวิโอไซด์ จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า การลดความดันเลือดเมื่อให้สติวิโอไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำนั้นเป็นผลมาจากผ่านการหลั่งไนตริกออกไซด์, โปรสตาแกรนดินและการทำงานของระบบซิมพาเธติก สติวิโอไซด์จะทำให้หลอดเลือดทั้งหลอดเลือดแอฟเฟอเร็นท์ และอีฟเฟอเร็นท์ของไตขยาย การเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการขับทิ้งของโซเดียม, คลอไรด์ ,กลูโคส, และโปแตสเซียมเป็นผลจากการลดการดูดกลับของโซเดียมที่หลอดฝอยไตส่วนต้น ซึ่งต่างจากการให้สติวิโอไซด์โดยการกินซึ่งจะมีผลที่ฝอยไตส่วนปลายมากกว่าส่วนต้น การเพิ่มขึ้นของกลูโคสในพลาสมาโดยผลของสารสติวิโอไซด์ คงจะเป็นผลจากปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์, โปรสตาแกรนดินและระบบซิมพาเธติค นอกจากนั้นสติวิโอไซด์ยังยับยั้งภาวะที่กลูโคสในพลาสมาสูงกระตุ้นการหลั่งอินซูลินด้วย

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

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 Na^+ (FE_{Na}),Cl^- (FE_{Cl}),glucose (FE_G) and K^+(FE_K) was significantly raised in both during and after SVS infusion. The lithium clearance method showed that the depression of proximal tubular Na^+ and water reabsorption correlated to the elevation of FE_{Na}. The first 30-min of SVS infusion suppressed the renal mitochondrial activity and Na^+,K^+ATPase activity ($P<0.05$) approximately 14% and 21% respectively while proximal tubular reabsorption of Na^+ reduced 88%. The rise of FE_{Na} and FE_{Cl} remained no matter how a change of renal hemodynamics was occured 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 FE_G SVS infusion raised the plasma glucose level (P_G) ($P<0.001$) but P_G was still lower than the renal plasma threshold of glucose in normal rats (264± 19.25 mg%). Moreover renal tubular reabsorption of glucose during SVS infusion was lower than the tubular transport maximum of glucose (Tm_G). SVS infusion raised P_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 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..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Narongsak Chaiyabutr

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Bungorn 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 delicated to my parent for their encouragement and constant support throuhhout my study.

CONTENTS

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

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

LIST OF FIGURES

Page

Page

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_{H2O}	=	Free water clearance
Posm	=	Plasma osmolality
C_{Li}	=	Lithium clearance
Na^+, K^+ 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-ω- nitro-L-arginine methyl ester
INDO	=	Indomethacin
NO	=	nitric oxide
FE_{Naprox}	=	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
μg	=	microgram
mg	=	miligram
L	=	Litre
ml	=	mililitre
min	=	minute

w/v	=	weight by volume
μmol	=	micromole
nmol	=	nanomole
mmol	=	milimole
Na^+, K^+ 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 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 staring forces at peritubular capillary was unlikely to be the cause since the increase of electrolyte excretion was remained inspite 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 occured 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.