

ผลของสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับแองจิโอเทนซิน-II ต่อการดูดกลับของหลอดไตฝอยส่วน proximal:
ศึกษาโดยวิธีลิเทียมเคลียร์แรนซ์

Effects of Angiotensin II Receptor Antagonist on Rat Proximal Tubular Reabsorption :
A lithium Clearance Study

ศิริวรรณ แซ่เตียว

Siriwan Saetew

๓

เลขหมู่	QP219 A๒๔ 25๔๓	๓.๒
Order Key	28816	
Bib Key	177590	
	10 ก.ค. 25๔๓	

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

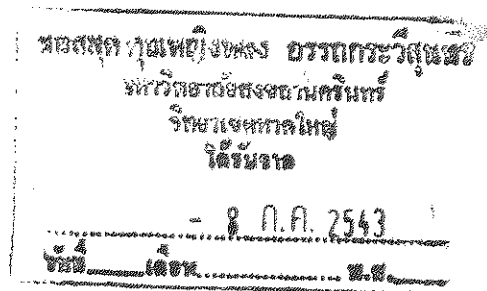
2543

ผลของสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับแองจิโอเทนซิน-II ต่อการดูดกลับของหลอดไตฝอยส่วน proximal:
ศึกษาโดยวิธีลิเทียมเคลียร์เรนซ์

Effects of Angiotensin II Receptor Antagonist on Rat Proximal Tubular Reabsorption :
A lithium Clearance Study

ศิริวรรณ แซ่เตียว

Siriwan Saetew



วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2543

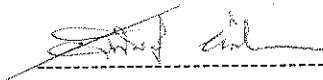
ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับแองจิโอเทนซิน-II ต่อการดูดกลับของหลอดเลือดฝอยส่วน proximal: ศึกษาโดยวิธีลิเทียมเคลียร์รานซ์

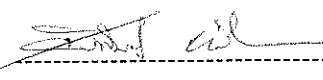
ผู้เขียน นางสาว ศิริวรรณ แซ่เตี๋ย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

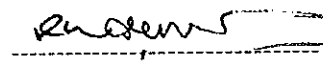
คณะกรรมการสอบ

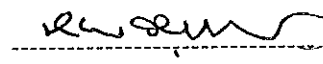
----- ประธานกรรมการ

----- ประธานกรรมการ

(ดร. ศิริพันธุ์ หิรัญญาชาติธาดา)

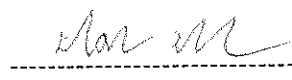
(ดร. ศิริพันธุ์ หิรัญญาชาติธาดา)

----- กรรมการ

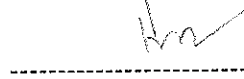
----- กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จำนงค์ สุภัทราวิวัฒน์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จำนงค์ สุภัทราวิวัฒน์)


----- กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ประดับ ประสาทแก้ว)

----- กรรมการ

(นายแพทย์ เจริญ เกียรติวัชรชัย)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

-----

(รองศาสตราจารย์ ดร. นพรัตน์ บำรุงรักษ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับแองจิโอเทนซิน-II ต่อการดูดกลับของหลอดเลือด
ฝอยส่วน proximal: ศึกษาโดยวิธีลิเทียมเคลียร์เรนซ์

ผู้เขียน นางสาว ศิริวรรณ แซ่เตียว

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

Angiotensin II (AII) นอกจากจะเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทต่อการทำงานของหลอดเลือดแดง
แล้วยังมีผลต่อการทำงานของหลอดเลือดฝอยอีกด้วย กลไกการออกฤทธิ์ของ AII จะผ่านตัวรับ (AT)
ที่จำเพาะ ซึ่งในปัจจุบันสามารถแบ่งย่อยออกเป็นอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ AT₁, AT₂ และ non AT₁
non AT₂ การศึกษาการทำงานของ AII วิธีหนึ่งคือใช้ receptor antagonist ปัจจุบัน candesartan
ถูกพัฒนาให้เป็น AT₁ receptor antagonist ที่มีความจำเพาะสูง การศึกษาผลของ AII โดยใช้
candesartan ต่อระบบไหลเวียนเลือดเป็นไปอย่างกว้างขวาง แต่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษา
ผลต่อการดูดกลับของหลอดเลือดฝอยส่วน proximal โดยใช้วิธี lithium clearance เลย วัตถุประสงค์
ในการทดลองครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของ candesartan ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดเลือดฝอย
ส่วน proximal โดยใช้วิธี lithium clearance รวมถึงผลต่อความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MABP), การ
ไหลเวียนพลาสมาที่ไต (RPF), อัตราการกรองของไต (GFR) และการขับทิ้ง sodium และ
potassium

การทดลองทำในหนู Wistar เพศผู้ น้ำหนักตัว 250-350 กรัม ทำให้สลบโดยใช้ inactin ขนาด
100 mg kgbw⁻¹ ฉีดสารละลาย clearance markers ซึ่งประกอบด้วย 8% polyfructosan, 1% para-
aminohippuric acid และ 4 mmol l⁻¹ lithium chloride ทางหลอดเลือดดำ jugular ในอัตรา 1.6 ml
hr⁻¹ 100 g bw⁻¹ ติดตามการเปลี่ยนแปลง MABP ทางหลอดเลือดแดง carotid และเก็บปัสสาวะ
ทางกระเพาะปัสสาวะ การทดลองแบ่งเป็น 5 กลุ่ม (กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มตามขนาดของ
candesartan ที่ได้รับอีก 4 กลุ่มคือ 0.1+5, 0.2+10, 0.5+25 และ 1.0+50 mg kg⁻¹ + µg kg⁻¹ min⁻¹)
ผลการทดลองภายหลังได้รับ candesartan ในช่วงเวลา 60 นาทีพบว่า 1) candesartan ทุกขนาดที่ใช้
ในการทดลองสามารถลด MABP, RPF และ GFR ยกเว้นที่ขนาด 0.1 mg kg⁻¹ + 5 µg kg⁻¹ min⁻¹ ไม่
ทำให้ค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลง และ 2) candesartan ทุกขนาดมีผลเพิ่มอัตราการขับทิ้ง sodium โดย
ลดอัตราการดูดกลับที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal ผ่านทางตัวรับชนิด AT₁

Thesis Title Effects of Angiotensin II Acceptor Antagonist on Rat Proximal Tubular
Reabsorption: A lithium Clearance Study.

Author Ms. Siriwan Saetew

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1999

Abstract

Angiotensin II (AII) plays a major role in the regulation of not only peripheral vascular resistance but also renal tubular function. Mechanism of action of AII is believed to exert via AII receptor subtypes namely AT_1 , AT_2 and non AT_1 non AT_2 . Various angiotensin II receptor antagonists have been used in order to study AII action. Candesartan, an AT_1 receptor antagonist has been developed with highly specific binding. The investigation of AII actions on circulatory system using candesartan has been widely performed, however, its action on renal proximal tubular reabsorption has not been yet reported. The purposes of the present study were to examine the effects of candesartan on proximal tubular reabsorption using a lithium clearance study. The effects on mean arterial blood pressure (MABP), renal plasma flow (RPF), glomerular filtration rate (GFR) and sodium potassium excretion were also investigated.

Male Wistar rat weighing 250-350 g were used. Anaesthesia was induced by intraperitoneal injection of Inactin (100 mg $kgbw^{-1}$). After completion of surgery, the clearance markers including 8% polyfructosan, 1% para-aminohippuric acid and 4 mmol l^{-1} lithium chloride were given through jugular vein at the rate of 1.6 ml hr^{-1} 100 gbw^{-1} . MABP was monitored through carotid artery canula and displayed on a chart recorder. Urine was collected via urinary bladder canula. Rats were divided into 5 groups (1 control and 4 candesartan treatment; 0.1 + 5, 0.2+10, 1.5+25 and 1.0+50 mg kg^{-1} + μg kg^{-1} min^{-1}). The results showed that after infusion of candesartan for 60 minutes 1) MABP, RPF and GFR were reduced with all doses except with the dose of 0.1+5 (mg kg^{-1} + μg kg^{-1} min^{-1}) these parameters were unchanged significantly and 2) candesartan increased urinary excretion of sodium by inhibiting AII stimulation action on proximal tubular sodium reabsorption via AT_1 .

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ คร. ศิริพันธุ์ หิรัญญาชาติธาดา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและสอนการใช้เทคนิคต่างๆในการทำวิจัย การเขียนและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ รวมทั้งให้กำลังใจและเป็นທີ່ปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จำนงค์ สุภัทธาวิวัฒน์ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์รวมถึงการเขียนและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ประดับ ประสาทแก้ว กรรมการสอบจากภาควิชาตรีวิทยาและนายแพทย์ เจริญ เกียรติวัชรชัย กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาแก้ไขปรับปรุงจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนขอขอบบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ ศจี อนันต์นพคุณ และคณะอาจารย์วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี สงขลา คณะอาจารย์ภาคตรีวิทยาทุกท่าน ที่สนับสนุนการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณ คุณสุภาพ นวลพลับ คุณเพทชาย หิรัญพันธุ์ ที่ช่วยแนะนำเทคนิคการใช้เครื่องมือในการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยสัคว์ทดลองทุกท่าน ขอขอบคุณวิไลกุล หนูแก้ว คุณสุธรรม และคุณธีรนุช จิตรพรหม ที่ให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ คุณเป็น รักเกิด ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนขอขอบคุณ คุณเยาวลักษณ์ หาญณรงค์ นื่องโตและ นื่องแห่มม ที่ช่วยเหลือการทำวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อแม่รวมทั้งสมาชิกในครอบครัวที่เป็นกำลังใจตลอดมา

ศิริวรรณ แซ่เตียว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	30
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
วิธีการ	33
3. ผลการทดลอง	39
4. วิจารณ์	57
5. สรุป	63
เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก	85
ประวัติผู้เขียน	92

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	การออกฤทธิ์ของ angiotensin II	9
1.2	บทบาทของฮอร์โมน angiotensin II ต่อการทำงานของไต	11
1.3	แสดงผลของฮอร์โมน angiotensin II ต่อการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal	24
3.1	time control experiment	40
 ภาคผนวก		
1	แสดงค่า mean arterial blood pressure (MABP), renal plasma flow (RPF), glomerular filtration rate (GFR) และ filtration fraction (FF) ของหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan	88
2	แสดงค่า urinary sodium excretion ($U_{Na}V$), fractional sodium excretion (FE_{Na}), urinary potassium excretion (U_KV) และ fractional potassium excretion (FE_K) ของหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan	89
3	แสดงค่า urine flow rate (V), lithium clearance (C_{Li}), fractional lithium excretion (FE_{Li}) และ fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}) ของหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan	90
4	แสดงค่าความเข้มข้นของ P_{PFS} , P_{PAH} , P_{Na} , P_K และ P_{Li} ของแต่ละช่วงเวลากการทดลองในหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan	91

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ส่วนประกอบต่างๆของระบบ renin-angiotensin	4
1.2	แสดงการจับแอก angiotensin II receptor subtype	8
1.3	แสดงการขนส่ง sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal	17
1.4	แสดงผลของฮอร์โมน angiotensin II ที่ความเข้มข้นต่ำ ($<10^{-9}$ M) ต่อการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal	20
1.5	ผลของฮอร์โมน angiotensin II ที่ความเข้มข้นสูง ($> 10^{-9}$ M) ต่อการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal	22
1.6	โครงสร้างทางเคมีของ candesartan	25
1.7	การขนส่ง lithium ที่หลอดไตฝอยส่วนต่างๆร่วมกับการขนส่ง inulin และน้ำ	29
2.1	แผนการทดลอง	36
3.1	แสดงค่า mean arterial blood pressure (MABP) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	41
3.2	แสดงค่า renal plasma flow (RPF) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่ม ที่ได้รับ candesartan	43
3.3	แสดงค่า glomerular filtration rate (GFR) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	44
3.4	แสดงค่า filtration fraction (FF) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	45
3.5	แสดงค่า urine flow rate (V) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	47
3.6	แสดงค่า sodium excretion rate ($U_{Na} V$) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	48

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.7	แสดงค่า fractional sodium excretion (FE_{Na}) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	49
3.8	แสดงค่า potassium excretion rate (U_KV) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	51
3.9	แสดงค่า fractional potassium excretion (FE_K) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	52
3.10	แสดงค่า lithium clearance (C_{Li}) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับcandesartan	54
3.11	แสดงค่า fractional lithium excretion (FE_{Li}) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan	55
3.12	แสดงค่า fractional proximal reabsorption of sodium (FPR_{Na}) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan	56
4.1	แสดงค่า changes in mean arterial blood pressure, renal plasma flow และ glomerular filtration rate ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ ได้รับ candesartan	62

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ACE	=	angiotensin converting enzyme
AI	=	angiotensin I
A II	=	angiotensin II
AT ₁	=	angiotensin receptor type 1
AT ₂	=	angiotensin receptor type 2
ATP	=	adenosine triphosphate
BBM	=	brush border membrane
BLM	=	basolateral membrane
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
DAG	=	diacylglycerol
GFR	=	glomerular filtration rate
IP ₃	=	inositol 1,4,5-triphosphate
JGA	=	juxtaglomerular apparatus
MABP	=	mean arterial blood pressure
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mmHg	=	millimetre mercury
NHE	=	sodium/hydrogen exchanger
PIP ₂	=	phosphatidyl inositol biphosphate
PKA	=	protein kinase A
PKC	=	protein kinase C
PLA ₂	=	phospholipase A ₂
PLC	=	phospholipase C
RAS	=	renin angiotensin system

ตัวอย่างและสัญลักษณ์ (ต่อ)

RPF = renal plasma flow

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

หลอดไตฝอยส่วน proximal (proximal tubule) มีหน้าที่หลักประการหนึ่งคือการดูดกลับ (reabsorption) สารที่สำคัญและเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น sodium, bicarbonate, สารอินทรีย์ต่างๆ เช่น glucose, amino acid และน้ำที่กรองผ่าน glomerulus ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หลอดไตฝอยส่วน proximal ดูดกลับเกลือแร่และน้ำประมาณร้อยละ 60-70 ของปริมาณที่กรอง (glomerular filtrate) ในจำนวนเกลือแร่ทั้งหมดที่ถูกกลับที่หลอดไตฝอยส่วนนี้ sodium เป็นเกลือแร่ที่ถูกกลับมีปริมาณมากที่สุด

การทำงานของหลอดไตฝอยส่วน proximal ในภาวะปกติ จะถูกควบคุมโดยระบบประสาทและฮอร์โมนหลายชนิด เช่น angiotensin II (AII), atrial natriuretic factor (ANF), parathyroid hormone (PTH) เป็นต้น ในจำนวนฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์ต่อหลอดไตฝอยส่วน proximal นี้ AII เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการดูดกลับ sodium และน้ำ การออกฤทธิ์ขึ้นกับระดับความเข้มข้นของ AII ในขณะนั้น คือในระดับความเข้มข้นต่ำ (10^{-12} - 10^{-9} mol l⁻¹) AII จะกระตุ้นการดูดกลับ sodium และน้ำ แต่ในระดับความเข้มข้นสูง (10^{-9} - 10^{-6} mol l⁻¹) AII จะยับยั้งการทำงานดังกล่าว ในภาวะปกติความเข้มข้นของ AII ใน plasma จะมีค่า 155 ± 26 pmol l⁻¹ (Braam, et al., 1993) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วนนี้

การศึกษาผลของ AII ต่อการทำงานของหลอดไตฝอยส่วน proximal ในสัตว์ทดลองแบบ *in vivo* experiment สามารถทำได้โดยใช้ 1) สารยับยั้งการสร้าง AII ได้แก่ renin inhibitors, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors หรือ 2) AII receptor antagonist ซึ่งปัจจุบันสามารถแบ่งตัวรับของ AII (angiotensin II receptor, AT) ได้อย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด AT₁, AT₂ และ non AT₁ non AT₂ การจำแนกอาศัยหลักการทางเภสัชวิทยา โดยตรวจสอบ sensitivity ของผนังเซลล์ต่างๆ ต่อสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับ (receptor antagonist) มีรายงานการทดลองว่า AT₁ จะ sensitive ต่อสารพวก losartan (Dup753), EXP3174, Dup532 และ candesartan (CV11974) ส่วน AT₂ จะ sensitive ต่อสารประกอบพวก PD compound เช่น PD123177, PD123319 และ PD124125 สำหรับ non AT₁ non AT₂ พบว่าไม่ sensitive ต่อสารทั้งสองกลุ่ม

candesartan จัดเป็น AT₁ antagonist ที่พัฒนามาจาก losartan เพื่อให้มีความจำเพาะมากขึ้น การศึกษาผลของ endogenous AII ที่ไตโดยใช้ candesartan ต่อการเปลี่ยนแปลง renal hemodynamics ให้ผลการทดลองที่ขึ้นกับขนาดและวิธีการทดลอง มีแนวโน้มว่า candesartan สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ผ่านทาง AT₁ ทำให้เกิด renal vasodilator และชักนำให้เกิดภาวะ natriuresis (Xiao, et al., 1995; Xiao, et al., 1996; Cervenka, et al., 1998) สำหรับผลของ candesartan ต่อ endogenous AII ในการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ปัจจุบันมีรายงานเฉพาะการศึกษาโดยวิธี microperfusion และพบว่า candesartan ที่ความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-8} mol l⁻¹ เมื่อฉีดเข้าไปทางด้าน lumen มีผลลดการดูดกลับ sodium และน้ำในอัตราที่ใกล้เคียงกันคือลดลง 21 ± 4.9 และ 23.6 ± 5.5 % ตามลำดับ (Smart, et al., 1999)

สำหรับวิธีการศึกษาการดูดกลับ sodium และน้ำของหลอดไตฝอยส่วน proximal สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี microperfusion ใช้สำหรับการศึกษาการทำงานของไตระดับ nephron และวิธี lithium clearance สำหรับการศึกษาระดับอวัยวะ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธี lithium clearance เพื่อศึกษาผลของ candesartan ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ร่วมกับศึกษาผลของ candesartan ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดแดงเฉลี่ย, การไหลเวียนเลือดที่ไต, อัตราการกรองของไต และการขับทิ้ง sodium และ potassium

การตรวจเอกสาร

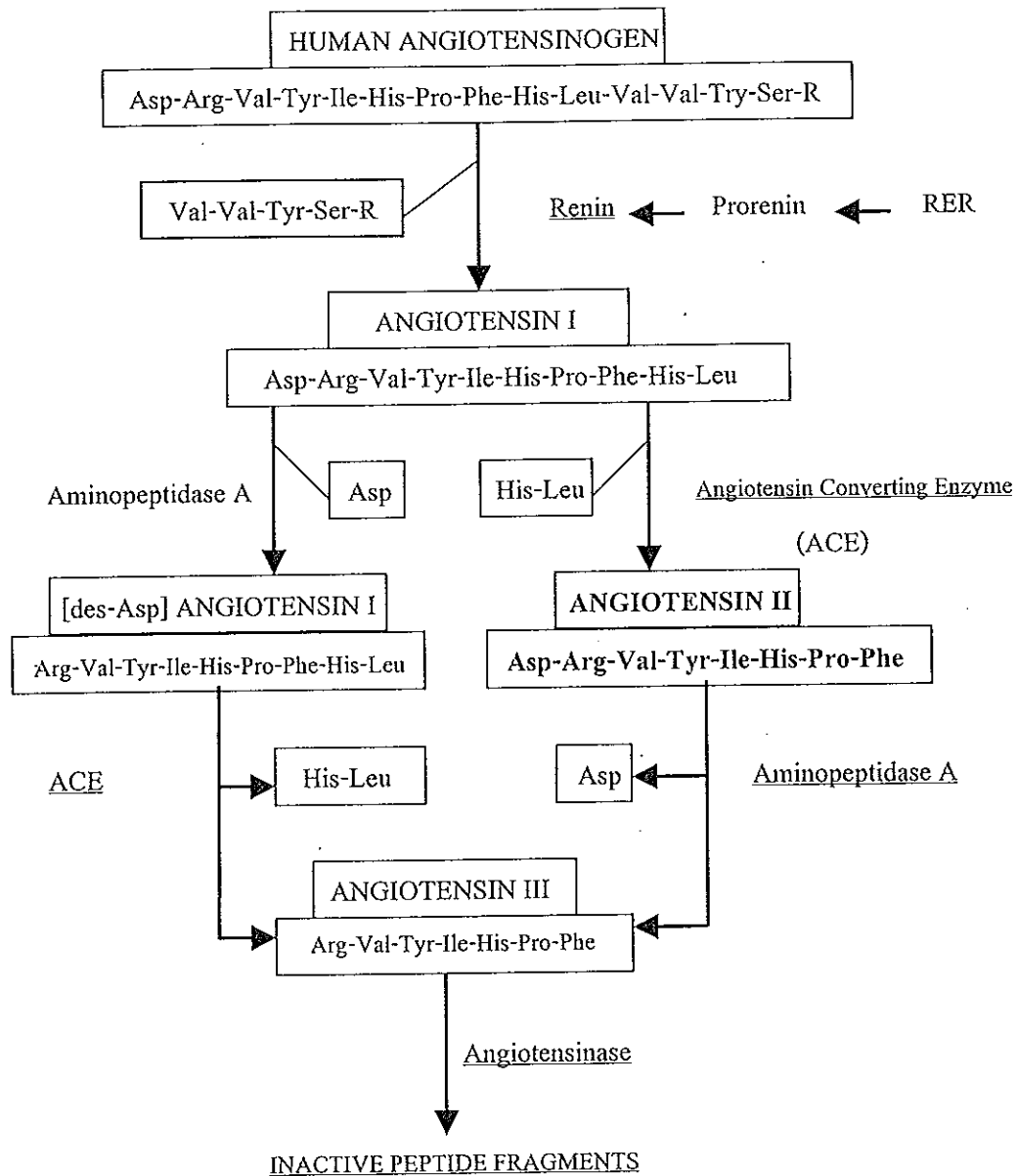
1. Angiotensin II

1.1 โครงสร้าง การสังเคราะห์ การคัดหลั่ง ตำแหน่งที่พบ และการย่อยสลาย

angiotensin II (AII) เป็นฮอร์โมนที่ประกอบด้วย amino acids 8 ตัว (octapeptide) มีบทบาทสำคัญใน renin angiotensin system (RAS) โดยระบบนี้มีเอนไซม์ renin เปลี่ยน angiotensinogen (Ao) ซึ่งเป็น substrate ให้กลายเป็น angiotensin I (AI) หลังจากนั้น AI จะถูก angiotensin converting enzyme (ACE) ซึ่งเป็น dipeptidyl-carboxy peptidase ที่พบมากบริเวณ หลอดเลือดฝอยของปอด ย่อยสลายกลายเป็น AII ซึ่ง AII ที่เกิดขึ้นนี้สามารถออกฤทธิ์ตามอวัยวะต่างๆ และอาจจะถูกเอนไซม์ aminopeptidase A ย่อยสลายต่อเป็น AIII นอกจากนี้เอนไซม์ angiotensinases ยังสามารถย่อยสลาย AIII ต่อไปเป็น inactive peptide fragments หรือโดยอีกทางหนึ่งเอนไซม์ aminopeptidase A ย่อยสลาย AI ได้เป็น (des-Asp) AI ซึ่งต่อมาจะถูก ACE ย่อยสลายเป็น AIII ดังแสดงในรูป 1.1

นอกจากจะพบ RAS ในระบบไหลเวียนเลือด (systemic or circulating RAS) แล้วยังพบระบบนี้ที่อวัยวะอื่นๆ ของร่างกายด้วย เช่น ต่อมหมวกไต (Aguilera, 1981), อัณฑะ (Pandey, et al., 1984), หลอดเลือดแดง (Bohr, 1974), สมอง (Bennet and Sayder, 1976) รวมทั้งที่ไต (Mendelsohn, 1976) ซึ่งเป็นที่เชื่อกันว่า AII ที่สร้างและคัดหลั่งจากระบบ RAS ที่อวัยวะเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของอวัยวะนั้นๆ ซึ่งแสดงถึงการทำงานของฮอร์โมน AII แบบ autocrine หรือ paracrine

สำหรับระบบ RAS ของไตนั้น พบว่าหลอดไตฝอยส่วน proximal เป็นตำแหน่งหลักที่พบการสร้าง AII โดยอาจใช้เอนไซม์เช่นเดียวกับที่สร้างในระบบไหลเวียนเลือด การสังเคราะห์สารตั้งต้นและเอนไซม์จะพบที่เซลล์เฉพาะในตำแหน่งต่างๆ ซึ่งจากการศึกษาด้วยวิธี hybridization histochemistry พบการแสดงออกของ angiotensinogen mRNA มากที่สุดในส่วน cortex รองลงไปพบที่ outer และ inner medulla ตำแหน่งที่พบบริเวณ cortex คือหลอดไตฝอยส่วน proximal ซึ่งพบเป็นปริมาณมากกว่าส่วน glomerulus และหลอดไตฝอยส่วน distal (Ingelfinger, et al., 1986; Ingelfinger, et al., 1990; Yanagawa, et al., 1991) สำหรับเอนไซม์ renin พบมากที่สุดในส่วน cortex (Robertson, et al., 1965) โดยพบที่เซลล์ juxtaglomerular, glomerular tufts, หลอดไตฝอยส่วน proximal, afferent และ efferent arterioles, interlobular artery และหลอดไตฝอยส่วน cortical



รูปที่ 1.1 ส่วนประกอบต่างๆของระบบ renin-angiotensin (คัดแปลลงจาก: สมชาย เข็มอ่อนง และคณะ) โดย RER = Rough Endoplasmic Reticulum, ACE = Angiotensin Converting Enzyme

collecting (Deschepper, et al., 1986; Taugner, et al., 1987; Gomez, et al., 1988; Chen, et al., 1994) มีรายงานการศึกษาไม่พบ renin mRNA ที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal แต่พบที่ juxtaglomerular apparatus (Deschepper, et al., 1986; Dzau, et al., 1987; Gomez, et al., 1989; Schunkert, 1991; Moe, et al., 1993) แสดงว่าหลอดเลือดฝอยส่วน proximal ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ renin แต่ renin อาจสร้างจากเซลล์ juxtaglomerular apparatus ผ่านการกรองที่ glomerulus และอาจถูกดูดกลับเก็บไว้บริเวณหลอดเลือดฝอยส่วน proximal สำหรับเอนไซม์ ACE สามารถตรวจพบได้ที่ afferent และ efferent glomerular arterioles (Caldwell; et al., 1976), ผนังเซลล์ด้าน luminal และ basolateral ของเซลล์หลอดเลือดฝอยส่วน proximal (Takada, et al., 1982) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า หลอดเลือดฝอยส่วน proximal น่าจะเป็นตำแหน่งหลักในการสร้าง AII ที่ไต

RAS ที่พบที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal อาจจะสามารถออกฤทธิ์ควบคุมการทำงานของไตได้ จากการที่ AII สามารถสร้างได้ที่หลอดเลือดฝอยส่วนนี้โดยไม่ว่า AII จะถูกคัดหลังจากเซลล์ หรือ AII จะถูกเปลี่ยนจากสารตั้งต้นคือ AI โดย ACE ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal หรือ AI ถูกเปลี่ยนเป็น AII โดยเอนไซม์อื่นที่ไม่ใช่ ACE ซึ่งยังไม่มีข้อมูลที่ยืนยันแน่ชัด แต่จากรายงานว่า ความเข้มข้นของ AII ที่หลอดเลือดดำจะใกล้เคียงหรือน้อยกว่าที่ระบบไหลเวียน systemic (Baillie, et al., 1971; Rosivall, et al., 1987) ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า AII ที่สร้างที่ไตอาจจะสามารถควบคุมการทำงานของไตโดยปราศจากผลจากระบบ systemic

ระดับความเข้มข้นของ AII ในของเหลวของหลอดเลือดฝอยส่วน proximal มีค่าสูงกว่าใน plasma 100-1000 เท่า โดย Seikaly และคณะ (1990) รายงานการศึกษาด้วยวิธี free flow micropuncture ในหนู Munich Wistar พบว่าของเหลวที่ผ่านการกรองจาก glomerulus เมื่อเข้าสู่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal มีความเข้มข้นของ AII เท่ากับ 29-40 nmol l⁻¹ ในขณะที่ความเข้มข้นของ AII ใน plasma มีค่า 32 pmol l⁻¹ ต่อมา Braam และคณะ (1993) ศึกษาในหนู Spague Dawley โดยวัดความเข้มข้นของ AII ในของเหลวที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal ของ superficial nephron (โดยปราศจาก AII ที่กรองผ่าน glomerulus) พบว่ามีค่า 13 ± 2 nmol l⁻¹ ในขณะที่ peritubular capillary มีค่า 155 ± 26 pmol l⁻¹ และต่อมาได้มีรายงานผลการทดลองสนับสนุนอีกมากมาย (Navar and Langford, 1994; Boer, et al., 1997; Mitchell, et al., 1997) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของ AII ระหว่างในหลอดเลือดฝอยส่วน proximal และใน plasma จะเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการดูดกลับ sodium และน้ำของหลอดเลือดฝอยส่วนนี้

AII ที่สร้างจากหลอดเลือดฝอยส่วน proximal เมื่อออกฤทธิ์แล้ว จะถูกย่อยสลายโดย angiotensinase ที่ไต โดยสามารถพบได้ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal ของหลอดเลือดฝอยส่วน proximal

และอัตราการย่อยสลายจะขึ้นกับอัตราการไหลของของเหลวภายในหลอดเลือด (Peterson, et al., 1979) สำหรับ AII ในระบบ systemic พบว่าจะถูกย่อยสลายที่หลอดเลือดไตส่วน postglomerular และใน interstitium, ระบบต่อมน้ำเหลืองที่ไต, renal epithelia หรือที่ของเหลวในหลอดเลือดฝอย (Carone and Peterson, 1980; Kriz, 1987)

1.2 Angiotensin II Receptor (AT)

ปัจจุบันสามารถจำแนก AII receptor โดยวิธีทางเภสัชวิทยาจากการใช้สาร angiotensin II receptor antagonist ได้อย่างน้อย 3 subtypes ได้แก่ AT₁, AT₂ และ non AT₁ non AT₂ ซึ่งการทำงานของ AII ผ่าน AT₁ จะถูกยับยั้งโดย competitive antagonist ชื่อ losartan (DuP753) (Chiu, et al., 1990c), EXP3174 (Wong, et al., 1990c), DuP532 (Wong, et al., 1991a) และ candesartan (Shibouta, et al., 1993) ในขณะที่ AT₂ จะถูกยับยั้งโดยสารประกอบพวก PD compound เช่น PD123177, PD123319 และ PD124125 (Timmermans, et al., 1993) ส่วน non AT₁ non AT₂ พบว่าสารทั้งสองกลุ่มไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ AII อย่างเฉพาะเจาะจงได้ (Timmermans, et al., 1992)

ในหนู AT₁ พบที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดง (Paxton, et al., 1993), ไต (DeGasparo, et al., 1990; Chang and Lotti, 1991; Song, et al., 1991; Edwards, et al., 1992c), ต่อมหมวกไตชั้น zona glomerulosa (Paxton, et al., 1993) และที่ตับ (Dudley, et al., 1990; DeGasparo, et al., 1990; Paxton, et al., 1993) ส่วน AT₂ นั้นพบที่ adrenal medulla (Chiu, et al., 1989a; Wiest, et al., 1991; Song, et al., 1991), สมอง (Chiu, et al., 1990a), มดลูก (Whitebread, et al., 1989) และรังไข่ (Pucell, et al., 1991) สำหรับประเภท non AT₁ non AT₂ ปัจจุบันยังไม่มีรายงานอ้างอิงทางกายวิภาคศาสตร์อย่างแน่ชัด

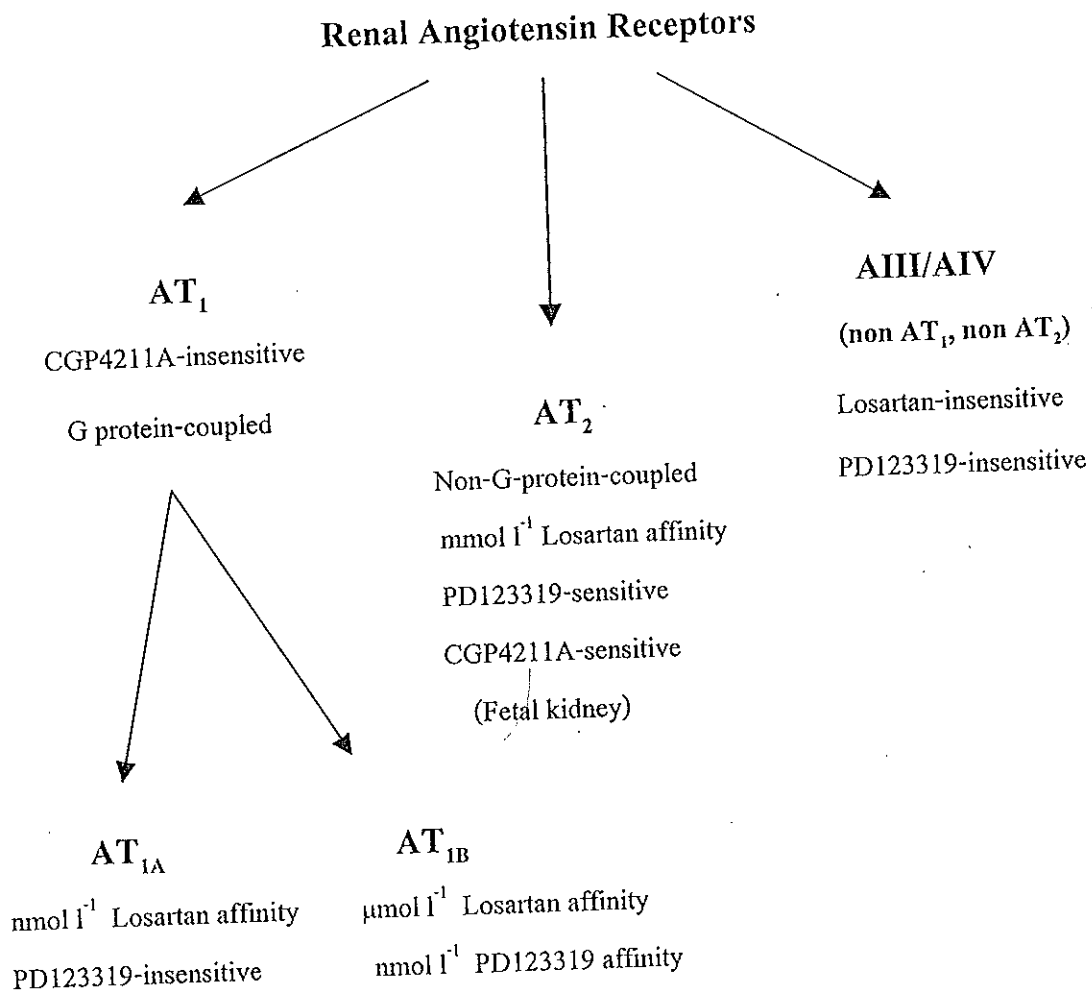
AII receptor ที่ไตหนูส่วนใหญ่เป็นชนิด AT₁ และพบ AT₂ บ้าง ซึ่งจากการศึกษาด้วยวิธี *in situ* autoradiographic ของ Sechi และคณะ (1992) โดยใช้ผนังเซลล์ไตแข็งของหนูเพื่อศึกษาชนิดและตำแหน่งของตัวรับ AII โดยใช้ AT₁ antagonist (losartan) และ AT₂ antagonist (PD123177) พบว่าตำแหน่งที่พบ AT₁ receptor ภายในไตคือ glomeruli, หลอดไตฝอยส่วน proximal, vasa recta, inner stripe ของ outer medulla ต่อมา มีรายงานการทดลองสนับสนุนของ Zhuo และคณะ (1994a,b) โดยประมาณว่า 95% ของ angiotensin receptor ที่พบที่ไตเป็นชนิด AT₁ โดยพบ AT₁ ที่ glomeruli, หลอดไตฝอยส่วน proximal, vasa recta, inner stripe ของ outer medulla เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานพบที่ afferent และ efferent arterioles, เซลล์ mesangial (Paxton, et al., 1993), หลอดไตฝอยส่วน proximal ที่ผนังเซลล์ทั้งด้าน luminal และ basolateral

และหลอดเลือดฝอยส่วน distal (Harrison, 1997) สำหรับตำแหน่งในไตหนูที่พบตัวรับชนิด AT₂ คือ glomeruli, หลอดไตฝอยส่วน proximal, innerstripe ของ outer medulla โดยจะพบในช่วงที่มีการพัฒนาของไตในขณะเป็นตัวอ่อน และจำนวน AT₂ จะลดลงและหายไปภายหลังคลอด 1 สัปดาห์ (Zhuo, et al., 1995a) นอกจากนี้ขณะเป็นตัวอ่อนจะมี AT₂ มากกว่า AT₁ ถึง 10 เท่า แต่หลังคลอด ปริมาณ AT₂ จะลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เชื่อว่า AT₂ อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุม fetal และ neonatal development (Grady, et al., 1991) สำหรับการศึกษายพบ AT₂ ที่ afferent arterioles (Arima, et al., 1996) และ efferent ของกระต่าย (Endo, et al., 1996) ปัจจุบันยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัด

ปัจจุบันสามารถใช้วิธี cloning จำแนก AT₁ ของไตหนูออกเป็น 2 subtype คือ AT_{1A} และ AT_{1B} (Iwai, et al., 1992; Kakar, et al., 1992a,b; Sandberg, et al., 1992) โดย subtype ชนิด AT_{1A} มี affinity สูงต่อ losartan แต่มี affinity ต่ำต่อ CGP42112 และ PD123319 โดยพบประมาณ 86 % ในจำนวน AT₁ ทั้งหมด ส่วน AT_{1B} พบประมาณ 14 % โดยมี affinity ต่ำต่อ losartan แต่มี affinity สูงต่อ PD123319 (Ernsberger, et al., 1992) (รูปที่ 1.2)

สำหรับที่ไตหนูสามารถพบ AT₁ ได้ทั้งสอง subtype จากการศึกษายแบบ *in situ* hybridization พบ AT_{1A} mRNA บริเวณเซลล์ mesangial และเซลล์ juxtaglomerular, หลอดไตฝอยส่วน proximal, vasa recta และเซลล์ interstitial ในขณะที่พบ AT_{1B} mRNA บริเวณเซลล์ mesangial, เซลล์ juxtaglomerular และใน renal pelvis (Gasc, et al., 1994; Karnik, et al., 1996) โดยจะพบระดับ AT_{1B} mRNA สูงบริเวณ papilla จนถึง ureter และพบ AT_{1B} mRNA ระดับต่ำใน vasa recta (Healy, et al., 1995)

นอกจากนี้ยังพบ AT_{1A} mRNA ที่อวัยวะอื่นๆ ได้แก่ vascular smooth muscle, หัวใจ, ปอด, รังไข่ และ hypothalamus (Kakar, et al., 1992b; Chiu, et al., 1993) ส่วน AT_{1B} พบที่ anterior pituitary, ต่อมหมวกไต และบริเวณ periventricular brain area (Chiu, et al., 1993; Unger, et al., 1996) การออกฤทธิ์ของ AII โดยผ่านทาง AT₁ ทั้งสอง subtype ปัจจุบันยังมีรายงานอ้างอิงไม่แน่ชัด



รูปที่ 1.2 แสดงการจำแนก angiotensin II receptor subtype โดย AT₁ = AII receptor subtype 1, AT₂ = AII receptor subtype 2, G-protein= guanosine phosphate-binding protein; AIII = angiotensin III; AIV = angiotensin IV (ที่มา: Janice, et al., 1994)

1.3 บทบาทของ angiotensin II

นอกจากนี้แล้ว AII ยังมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย ดังสรุปไว้ในตารางที่ 1.1

ตาราง 1.1 การออกฤทธิ์ของ angiotensin II

การศึกษาที่พบ	เอกสารอ้างอิง
▪ กระตุ้นการคัดหลั่ง antidiuretic hormone	Malvin and Vander, 1967
▪ กระตุ้นศูนย์ควบคุมการกระหายน้ำ (thirst center) ในสมอง	Fitzsimons, 1972
▪ กระตุ้นการกระหายเกลือ (salt appetite)	Chiaraviglio, 1976
▪ มีผลต่อการสร้างและหลั่งฮอร์โมน aldosterone	Gross, 1968; Hall, 1986a;
▪ กระตุ้นการกระหายเกลือ โดยออกฤทธิ์เสริมกับฮอร์โมน aldosterone	Sakai, et al., 1986
▪ มีบทบาทในการกระตุ้นการสังเคราะห์ protein ใน cultured vascular smooth muscle cells	Berk, et al., 1989.
▪ มีบทบาทในการเจริญเติบโตของ vascular smooth muscle cells	Owens, 1989; Ray, et al., 1994;
▪ มีผลกระตุ้นการสร้าง collagen ใน cultured vascular smooth muscle cells	Kato, et al., 1991
▪ มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ผ่านทาง AT ₁	Wong, et al., 1990c; Bunkenburg, et al., 1992; Sachinidis, et al., 1993
▪ มีผลต่อพัฒนาการของตัวอ่อนในระยะ fetus ผ่านทาง AT ₂	Grady, et al., 1991
▪ มีผลเพิ่มความเข้มข้นของ free calcium ใน cytoplasm โดยมีกลไกผ่านทาง AT ₁	Koh, et al., 1994
▪ มีผลต่อการคั่งน้ำมากขึ้นโดยกลไกผ่านทาง AT ₁ ที่ adrenal cortex ชั้น zona glomerulosa	Blair-West, et al., 1997

2. บทบาทของฮอร์โมน angiotensin II ต่อการทำงานของไต

บทบาทของ AII ต่อการทำงานของไตสรุปดังตารางที่ 1.2

2.1 บทบาทของ AII ต่อการไหลเวียนเลือดที่ไต

ได้มีการศึกษาผลของ exogenous AII ต่อการไหลเวียนเลือดที่ไตอย่างกว้างขวาง พบว่า AII เพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดไต (renal vascular resistance) การออกฤทธิ์ของ AII ทำให้เกิด vasoconstriction ของ afferent arteriole และ efferent arteriole ซึ่งเป็นตำแหน่งหลักในการทำให้เกิดความต้านทานของหลอดเลือดภายในไต ผลที่ตามมาคือ renal blood flow (RBF) ลดลง (Navar and Langord, 1974) จากรายงานการศึกษาการเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดภายในไต มีความแตกต่างกันบ้าง โดย Yuan และคณะ (1990) พบว่า AII ทำให้ความต้านทานของ efferent arteriole มากกว่า afferent arteriole ในขณะที่ Kimula และคณะ (1997) พบว่าความต้านทานของหลอดเลือดทั้งสองไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีผลต่อ glomerular filtration rate (GFR) แตกต่างกันได้ โดยอาจมีผลเพิ่ม, ลด หรือไม่เปลี่ยนแปลง GFR เช่น การเพิ่มขึ้นของ hydrostatic pressure ใน glomerular capillary (P_{GC}) จากการที่ความต้านทานของ efferent arteriole มากกว่า afferent arteriole ทำให้ค่า GFR เพิ่มขึ้น หรือถ้าผลต่อความต้านทานของหลอดเลือดทั้งสองไม่แตกต่างกัน ทำให้ GFR ไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่การลดลงของ RBF และการหดตัวของ mesangial cell จากผลของ AII ทำให้สัมประสิทธิ์การกรองที่ไตลดลง (K_p) (Foidart, et al., 1980; Ardailou, et al., 1987) มีผลให้ GFR ลดลง ดังนั้นผลลัพธ์รวมของ AII ต่อ GFR จะขึ้นกับภาวะต่างๆดังกล่าว

สำหรับที่ไตการออกฤทธิ์ของ AII พบว่าโดยส่วนใหญ่ผ่านทาง AT_1 ซึ่งมีผลต่อการควบคุมความดันเลือดที่ไต (renal arterial pressure) และการทำงานของไต ส่วนการออกฤทธิ์ผ่าน AT_2 ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ว่ามีผลต่อการควบคุมความดันเลือด เนื่องจากการศึกษาในหนู mice ที่ขาดยีนควบคุมการสร้าง AT_2 พบว่าเมื่อได้รับ AII ความดันเลือดจะเพิ่มขึ้น และการขับ sodium ทางปัสสาวะลดลง โดยจะพบการหลั่ง bradykinin, nitric oxide และ cGMP ที่ไตลดลง (Siragy, et al., 1999) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในภาวะปกติ AT_2 มีบทบาทสำคัญต่อการรักษาสมดุลของความดันเลือด และการสร้างปัสสาวะด้วยเช่นกัน

AII ควบคุมการดูดกลับ sodium และน้ำของหลอดไตฝอยส่วน proximal อาจเกิดโดยผ่านทาง AT_1 เนื่องจากพบว่าระดับ AII ในหลอดไตฝอยส่วน proximal มีผลต่อการควบคุมปริมาณของ AT_1 ที่หลอดไตฝอยส่วนนี้ จากการศึกษาโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์หลอดไตฝอยส่วน proximal พบว่า AII ที่ความเข้มข้น 10^{-11} - 10^{-7} mol l⁻¹ มีผลเพิ่มระดับทั้ง AT_1 mRNA และตัวรับที่จำเพาะของ ¹²⁵I AII โดยขึ้นกับความเข้มข้นของ AII ที่ใช้ ในขณะที่ให้ ACE inhibitor จะพบ

ตารางที่ 1.2 บทบาทของฮอร์โมน angiotensin II ต่อการทำงานของไต

การศึกษาที่พบ	เอกสารอ้างอิง
◆ ลด RBF และ GFR แต่มีผลเพิ่ม FF	Navar and Langford, 1974
◆ กระตุ้นการหดตัวของ mesangial และ ลดขนาดของ glomerulus, filtration surface area และ K_f	Foidart, et al., 1980; Ardaillou, et al., 1987
◆ ทำให้เกิด vasoconstriction ของ efferent arteriole > afferent arteriole	Yuan, et al., 1990
◆ vasoconstriction ของ efferent arteriole = afferent arteriole	Kimula, et al., 1997
◆ ออกฤทธิ์ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำ ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เป็นแบบ biphasic action	Harris, 1977; Schuster, et al., 1984
◆ ควบคุมการขนส่ง sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal โดยผ่าน $\text{Na}^+ \text{-HCO}_3^-$ cotransporter, Na^+/K^+ ATP ase ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral	Liu and Cogan, 1987a; Garvin, 1991; Aperia, et al., 1994
◆ ควบคุมการขนส่ง sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal โดยผ่าน โปรตีน $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ exchanger ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal	Liu and Cogan, 1988; Mitchell and Navar, 1990; Wang and Chan, 1990
◆ ยับยั้งการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน distal	Lowitz, et al., 1969
◆ เพิ่มการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal	Rahman, et al., 1993
◆ ไม่มีผลต่อการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal	Fransen, et al., 1995
◆ กระตุ้น gluconeogenesis ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal	Guder, 1979
◆ กระตุ้นการคัดหลั่งและลด reuptake ของ noradrenergic ที่หลอดไตฝอยส่วน	Zimmerman, et al., 1987
◆ เป็น growth factor สำหรับเซลล์ของไต	Norman, et al., 1987
◆ มีบทบาทในการเจริญเติบโตของเซลล์หลอดไตฝอยส่วน proximal	Wolf and Neilson, 1990
◆ กระตุ้นการคัดหลั่ง H^+ ที่หลอดไตฝอยส่วน early proximal tubule	Liu and Cogan, 1988

ว่า AT₁ mRNA ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ลดลง 40% (Cheng, et al., 1995) จากผลที่สอดคล้องกันนี้เป็นไปได้ว่า AT₁ mRNA ที่เพิ่มขึ้นจากระดับของ AII ที่เพิ่มขึ้นโดยไม่ว่าจะเป็นที่ systemic หรือภายในไตเองน่าจะมีความสำคัญต่อการเพิ่มการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal

2.2 ผลของ angiotensinII ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำของหลอดไตฝอยส่วน proximal

2.2.1. กายวิภาคและสรีรวิทยาของหลอดไตฝอยส่วน proximal

หลอดไตฝอยส่วน proximal ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมแบ่งได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือหลอดไตฝอยส่วน proximal convoluted (pars convoluta หรือ PCT) และหลอดไตฝอยส่วน proximal straight (pars recta หรือ PST) (Kriz and Bankier, 1988) นอกจากนี้ยังมีการแบ่ง PCT และ PST ออกเป็นส่วน (segment) ต่างๆได้อีก คือหลอดไตฝอยส่วน S1 หรือ P1 หมายถึงส่วนต้นและส่วนกลางของ PCT หลอดไตฝอยส่วน S2 หรือ P2 หมายถึงส่วนปลายของ PCT รวมกับส่วนต้นของหลอดไตฝอย PST หลอดไตฝอยส่วน S3 หรือ P3 หมายถึงส่วนที่เหลือของ PST ทั้งหมด ซึ่งจะอยู่ชั้นแถบนอก (outer stripe) ของไต (Kriz and Bankir, 1988)

1) หลอดไตฝอยส่วน proximal convoluted (PCT)

PCT เป็นหลอดไตฝอยที่มีขนาดใหญ่และยาวที่สุด เซลล์ของ epithelial เป็นเซลล์ columna ชั้นเดียวมี microvilli และแขนงของ cytoplasm ขึ้นออกทางด้านข้าง (lateral process) ประสานกับแขนงข้างของเซลล์ข้างเคียงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวทางด้านที่สัมผัสกับของเหลวที่กรองจาก plasma ทำให้การดูดกลับสารต่างๆเกิดขึ้นได้มาก ผนังเซลล์ด้าน basolateral ของเซลล์หลอดไตฝอยพบเอนไซม์ Na⁺/K⁺-ATPase ซึ่งทำหน้าที่ขับ sodium ออกจากเซลล์ และดึง potassium เข้าสู่เซลล์ จึงทำให้ primary active sodium transport เกิดขึ้นได้มาก ส่วนการขนส่ง sodium ทางผนังเซลล์ด้าน luminal เป็นแบบ secondary active transport ซึ่งเกิดขึ้นได้มากเช่นกัน (Jacobson, 1981)

2) หลอดไตฝอยส่วน proximal straight (PST)

เซลล์ของ epithelium มีรูปร่างแตกต่างไปจาก PCT คือมี mitochondria น้อยกว่า การดูดกลับ sodium และน้ำที่ส่วนนี้มีน้อยกว่าที่ PCT แต่มีความสำคัญในการดูดกลับกรดอินทรีย์ เช่น กรดยูริก (uric acid), พาราอะมิโนฮิปโปเรต (para-aminohippurate) เป็นต้น (Jacobson, 1981)

2.2.2 กลไกการดูดกลับของเหลวที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal

ได้มีผู้เสนอแนวคิดและทฤษฎีอธิบายการดูดกลับของเหลวที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal ไว้ดังนี้

2.2.2.1 การดูดกลับของเหลวที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal เป็นชนิด isosmotic โดยเซลล์หลอดเลือดฝอยส่วน proximal มีลักษณะเป็น leaky epithelium คือมีคุณสมบัติยอมให้น้ำซึมผ่านได้ จากการศึกษาโดยวิธี micropuncture พบว่า osmolality ของ plasma และของเหลวในหลอดเลือดฝอยส่วน proximal ไม่แตกต่างกัน (Walker, et al., 1941; Morel and Muruyama, 1970; Alan, 1994) ทำให้เชื่อว่ากลไกการขนส่งของเหลวที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal เป็นแบบกระบวนการ isosmotic ซึ่งสามารถพบได้ทั้งที่ PCT (Gottschalk and Mylle, 1959; Kokko, et al., 1971) และ PST (Schafer, et al., 1974)

การดูดกลับชนิด isosmotic ที่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal จะเกิดขึ้นเมื่อมีการดูดกลับน้ำ (จากคุณสมบัติที่หลอดเลือดฝอยส่วนนี้ยอมให้น้ำซึมผ่านได้) ร่วมกับการดูดกลับ sodium โดยอาศัยพลังงานและส่วนน้อยจากการขนส่งที่เกิดจาก electrical และ chemical gradient มีรายงานการศึกษาที่สนับสนุนการดูดกลับ sodium โดยอาศัยพลังงาน ดังนี้

ก. sodium สามารถขนส่งโดยดำน concentration gradient (Giebisch, et al., 1964; Kokko, et al., 1971; Vandewalle, et al., 1981)

ข. sodium สามารถขนส่งโดยดำน electrical gradient (Barratt, et al., 1974; Fromter and Gessner, 1974; Schafer, et al., 1978; Berry, 1983; Schafer, et al., 1990)

ค. การดูดกลับของเหลวชนิด isosmotic จะเกิดได้มากขึ้นเมื่อมีการดูดกลับ sodium โดยพบว่าถ้าแทนที่ sodium ด้วย cations อื่นๆเช่น lithium จะมีผลยับยั้งการดูดกลับ sodium (Burg and Green, 1976)

ง. การดูดกลับของของเหลวและการขนส่ง sodium จะหยุดลงเมื่อยับยั้งเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase (Kinne, et al., 1971; Schmidt and Dubach, 1971)

จ. การเผาผลาญออกซิเจนของไตและการดูดกลับ sodium มีความสมดุลกัน (Gullans, et al., 1985)

2.2.2.2 การดูดกลับของของเหลวเกิดจากความแตกต่างของ osmotic pressure ระหว่างของเหลวในส่วน lumen และ interstitium (Andreoli and Schafer, 1979a,b) โดยของเหลวใน lumen จะ hypotonic เมื่อเปรียบเทียบกับของเหลวใน interstitium และ peritubular capillaries ซึ่งพบว่าแตกต่างกันเล็กน้อยประมาณ $5 \text{ mosmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ (Schafer, 1984) Green และ Giebisch (1984) ได้ทดลองให้ normal saline สู่หลอดเลือดฝอยส่วน proximal และ

peritubular capillaries หรือมากขึ้น พบว่าของเหลวในส่วนหลอดไตฝอย proximal จะเป็น hypotonic ($-1.7 \text{ mosmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) เมื่อให้ normal saline ในอัตรา 10 nl min^{-1} และจะ hypotonic มากขึ้น ($-3.9 \text{ mosmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) เมื่อให้ในอัตรา 45 nl min^{-1} และพบว่า การดูดกลับของเหลวจะมี ปริมาตรเพิ่มขึ้นเมื่อของเหลวในหลอดไตมีความเป็น hypotonic มากขึ้น

2.2.2.3 สมมุติฐาน anion asymmetry (Andreoli and Schafer, 1979a, b; Green and Giebisch, 1984) โดยผนังเซลล์ด้าน luminal มีการขนส่งแบบ Na^+/H^+ exchanger เพื่อดึง sodium จากของเหลวในหลอดไตฝอยเข้าเซลล์ ส่วน H^+ จะเคลื่อนที่ในทิศทางกลับกัน ขณะเดียวกันการดูดกลับของ bicarbonate จะเพิ่มมากขึ้นกว่า chloride ดังนั้นปริมาณของ chloride จะสูงขึ้นเกิด concentration gradient และเกิด electrical gradient ขึ้นผลักดันให้ chloride เคลื่อนผ่านบริเวณรอยต่อเข้าไปทางช่องว่างระหว่างเซลล์หลอดไตฝอย (paracellular space) แบบ passive ร่วมกับการขนส่ง sodium และน้ำ โดย Schafer และคณะ (1975) ได้แยกหลอดไตฝอยส่วน PST ของหนู มาศึกษาพบว่า การเพิ่ม concentration gradient ของ chloride ระหว่างของเหลวใน lumen กับ peritubular capillaries มีผลเพิ่มการดูดกลับของ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วนนี้ อย่างไรก็ตามการขนส่งของเหลวที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ยังคงต้องอาศัยกลไกอื่นๆร่วมด้วย

ส่วนการที่ของเหลวและน้ำเคลื่อนที่จาก interstitial space สู่ peritubular capillary หรือเคลื่อนที่กลับเข้าสู่หลอดไตฝอยทาง paracellular ขึ้นอยู่กับแรงดันที่สำคัญ 2 ชนิดคือ 1) hydrostatic pressure และ 2) oncotic pressure พบว่าการเคลื่อนที่ของของเหลวมีความสัมพันธ์ เป็นสมการดังนี้

$$J_v = K_r (\pi_c - \pi_i) - (P_c - P_i)$$

เมื่อ J_v = อัตราการการเคลื่อนที่ของของเหลวผ่านผนังหลอดไตฝอย

K_r = ความสามารถในการซึมผ่านได้ของผนังหลอดไตฝอย

π_c = capillary oncotic pressure

π_i = interstitium oncotic pressure

P_c = capillary hydrostatic pressure

P_i = interstitium hydrostatic pressure

เนื่องจาก P_i และ π_c มีทิศทางของแรงดันดันเข้าหลอดเลือด จึงทำให้มีการดูดกลับของของเหลวสู่ peritubular capillary ตรงข้ามกับ P_c และ π_i ที่มีทิศทางของแรงดันดันออกนอก

หลอดเลือด ดังนั้นจากสมการข้างต้นถ้า π_c เพิ่มขึ้นและ P_c ลดลง จะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของของเหลวจาก interstitium สู่หลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้ P_i ลดลงและลดการรั่วกลับ ซึ่งผลโดยรวมทำให้เพิ่มการดูดกลับของของเหลวที่หลอดไตฝอยส่วน proximal

2.2.3 การขนส่ง sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal

2.2.3.1 การขนส่ง sodium ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral

การขนส่ง sodium จากหลอดไตฝอยส่วน proximal สู่ peritubular capillaries เป็นการขนส่งโดยใช้พลังงานอาศัยเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase การทดลองโดยวิธี *in vivo* micropuncture (Gyory and Kinne, 1971) และ microperfusion (Burg, 1981) ของหลอดไตฝอยส่วน proximal พบว่าการใช้สาร ouabain ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase จะสามารถยับยั้งการดูดกลับ sodium และน้ำได้ นอกจากนี้จากการศึกษาด้วยวิธีทางชีวเคมีพบว่าการเผาผลาญออกซิเจนและการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วนนี้มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง (Kill, et al., 1961) ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าการขนส่ง sodium จากหลอดไตฝอยส่วน proximal สู่ peritubular capillaries ส่วนหนึ่งเป็นการขนส่งโดยใช้พลังงานและอาศัยเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase

2.2.3.2 การขนส่ง sodium ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal

ก. การขนส่ง sodium ร่วมกับการขนส่งกลูโคส, กรดอะมิโน และสารอินินทรีย์ (co-transport of sodium with glucose, amino acid and inorganic anions)

ผนังเซลล์ด้าน luminal ของหลอดไตฝอยส่วน proximal มีการขนส่ง sodium ร่วมกับการขนส่ง 1) D-glucose และ D-galactose, 2) กรดอะมิโน, 3) สารอินินทรีย์ เช่น ฟอสเฟต และซัลเฟต โดยอาศัยพาหะเฉพาะ (Rector, 1983) ดังแสดงในรูป 1.3 จากการศึกษาการขนส่ง sodium โดยใช้สารยับยั้งการขนส่งกลูโคสที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เช่น phlorizin พบว่าการดูดกลับ sodium และของเหลวที่บริเวณนี้ลดลง (Walker, et al., 1941) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการขนส่งเส้นทางนี้มีความสำคัญต่อการควบคุมการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วนนี้มาก โดยเฉพาะการดูดกลับ glucose (Barfuss and Schafer, 1984a,b) และกรดอะมิโน (Lingard, et al., 1973) ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เนื่องจากเมื่อมีการดูดกลับสารเหล่านี้จะเกิด osmotic gradient ขึ้นส่งผลให้เกิดการดูดน้ำกลับโดยกระบวนการ osmosis

ข. การขนส่ง sodium โดย Na^+/H^+ exchanger

หลอดไตฝอยส่วน proximal ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีความสามารถทำให้ของเหลวภายในเป็นกรด โดยการคัดหลั่ง H^+ แลกเปลี่ยนกับการดูดกลับ sodium และ bicarbonate (Rector, 1983) ดังนั้นภาวะที่ pH ในเซลล์ลดต่ำลง จะมีผลกระตุ้นการสร้างกรด

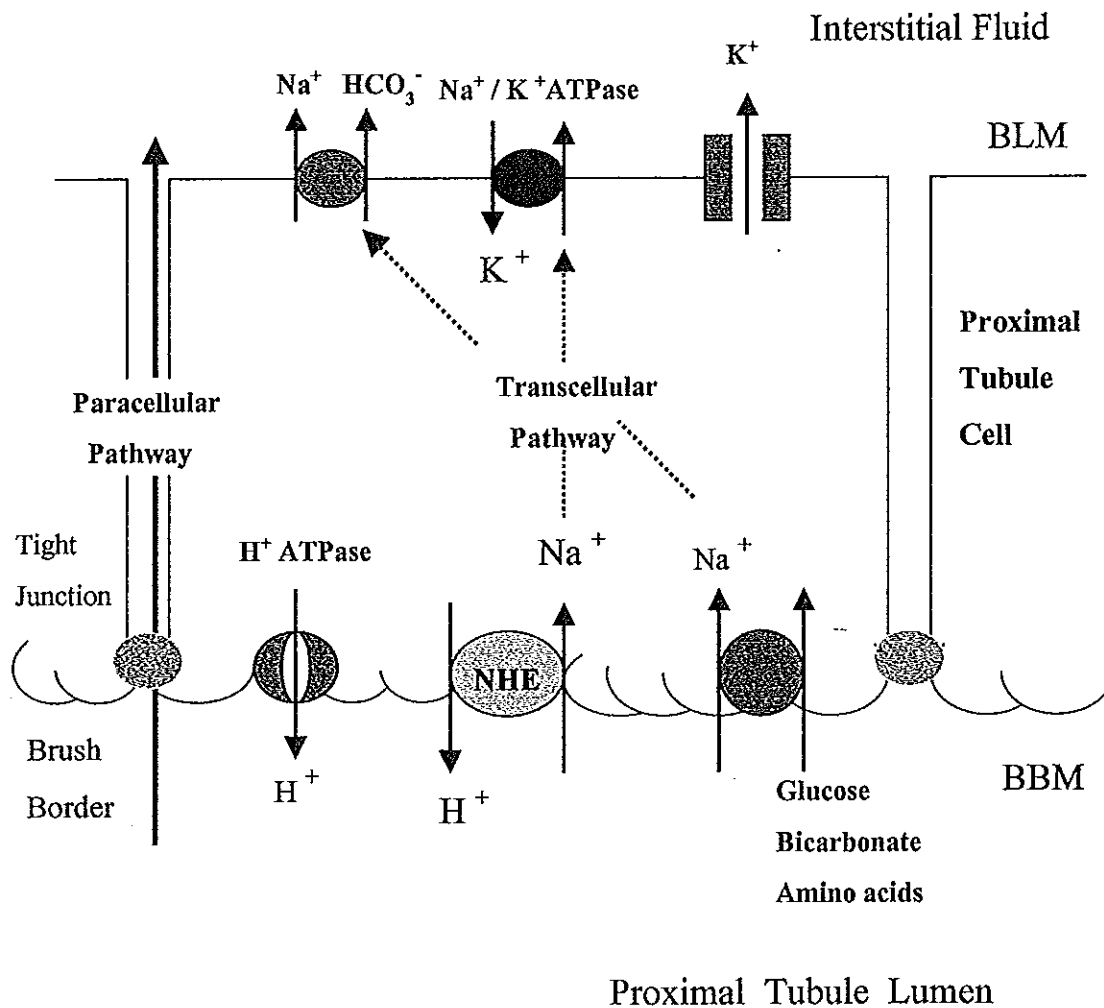
คาร์บอนิก โดยการคัดหลัง H^+ ผู้ tubular lumen แลกเปลี่ยนกับการดูดกลับ sodium ผู้เซลล์ (Aronson, et al., 1982) ดังแสดงในรูป 1.3

ปัจจุบันสามารถจำแนกโปรตีน Na^+/H^+ exchanger โดยวิธี cloning ได้ออกเป็นอย่างน้อย 4 isoform คือ NHE-1, NHE-2, NHE-3 และ NHE-4 (Sardet, et al., 1989; Reilly, et al., 1991; Tse, et al., 1993a, 1993b; Orłowski, et al., 1992; Biemesderfer, et al., 1993; Wang, et al., 1993) ซึ่งมีรายงานว่า NHE-1 พบได้ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal, distal และ collecting ของไตหนู โดยเชื่อว่ามีหน้าที่สำคัญในการควบคุมปริมาณน้ำในร่างกายและความเป็นกรด-ด่างของเซลล์ (Paillard, 1997) ชนิด NHE-2 พบที่หลอดไตฝอยส่วน proximal และ ส่วน inner medullary collecting ชนิด NHE-3 พบมากที่หลอดไตฝอยส่วน proximal และ thick ascending limb of Henle's loop โดยมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการดูดกลับ sodium และน้ำ ประมาณ 50% ของการดูดกลับของเหลวทั้งหมด (Chantrelle, et al., 1982; Howlin, et al., 1985; Preisig and Rector, 1988) ในขณะที่ NHE-4 พบที่หลอดไต ฝอยส่วน medullary collecting (Biemesderfer, et al., 1993; Wakabayashi, et al., 1994; Amemiya, et al., 1995)

การขนส่ง sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal พบว่าถูกควบคุมโดยฮอร์โมนและสารสื่อประสาท (neurotransmitter) เช่น AII (Harris, 1992), Atrial natriuretic peptide (Sonnerberg, et al., 1986) และ norepinephrine (Chan, 1980) เป็นต้น โดยการออกฤทธิ์ของ AII ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วนนี้พบว่ามีกลไกผ่านทาง NHE-3 (Chantrelle, et al., 1982)

การทำงานของ AII ผ่าน NHE-3 นั้นจะมีกลไกผ่านทาง second messenger หลายชนิดประกอบด้วย

- (1) ผ่านทาง cAMP (Liu and Cogan, 1989; Douglas, et al., 1990) และ cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Kahn, et al., 1985; Morell, et al., 1990b)
- (2) การเพิ่มของ calcium ภายในเซลล์จาก phospholipase C (PLC)-inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) (Wirthensohn, et al., 1984; Wirthensohn and Guder, 1985)
- (3) ผ่านทาง PLC-diacyl-glycerol (DAG) และ Ca^{2+} -dependent protein kinase (PKC) (Liu and Cogan, 1990; Wang and Chan, 1991)
- (4) การเพิ่มขึ้น ของ calcium ใน cytoplasm จาก arachidonic-5,6-epoxy-eicosatrienoic acid (5,6-EET) (Douglas, et al., 1990)
- (5) ผ่านทาง G-protein ซึ่งจับกับ PLA (Morduchowicz, et al., 1991)



รูปที่ 1.3 การขนส่งโซเดียมที่หลอดไตฝอยส่วน proximal (ดัดแปลงจาก: Smart, 1999)

โดย BLM = basolateral membrane, BBM = brush border membrane or luminal membrane, NHE = Na⁺/H⁺ exchanger, Na⁺/H⁺ ATPase = sodium, hydrogen-activated adenosine triphosphatase, Na⁺/K⁺ ATPase = sodium, potassium-activated adenosine triphosphatase, H⁺ ATPase = hydrogen-activated adenosine triphosphatase

ค. การขนส่ง sodium โดยแลกเปลี่ยนกับ calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange)

Taylor และ Windhager (1979) เสนอว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ calcium ภายในเซลล์ มีผลเพิ่มการขนส่ง sodium โดยที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ของกระต่าย และพบการแลกเปลี่ยนระหว่าง sodium กับ calcium เกิดขึ้นมาก (Dominguez, et al., 1992) ในขณะที่สุนัขพบ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange เฉพาะที่หลอดไตฝอยส่วน connecting ด้าน basolateral เท่านั้น (Bourdeau, et al., 1993) นอกจากนี้การให้สาร quinidine และ A23187 ซึ่งมีผลเพิ่ม calcium อิสระภายในเซลล์ จะมีผลยับยั้งการขนส่ง sodium (Friedman, et al., 1981) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ calcium ภายในเซลล์หลอดไตฝอยส่วน proximal จึงมีผลต่อการขนส่ง sodium ที่หลอดไตฝอยส่วนนี้

นอกจากนี้กลไกการขนส่ง sodium ทาง $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange ยังขึ้นกับความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าของ sodium ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase (Mullins, et al., 1977; Gmaj, et al., 1979) เช่นเดียวกันการเพิ่มความเข้มข้นของ calcium ภายในเซลล์จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase (Yingst and Hoffman, 1981) และมีผลต่อการแลกเปลี่ยน sodium กับ H^+ ที่หลอดไตฝอยส่วนนี้ด้วย (Douglas, et al., 1990)

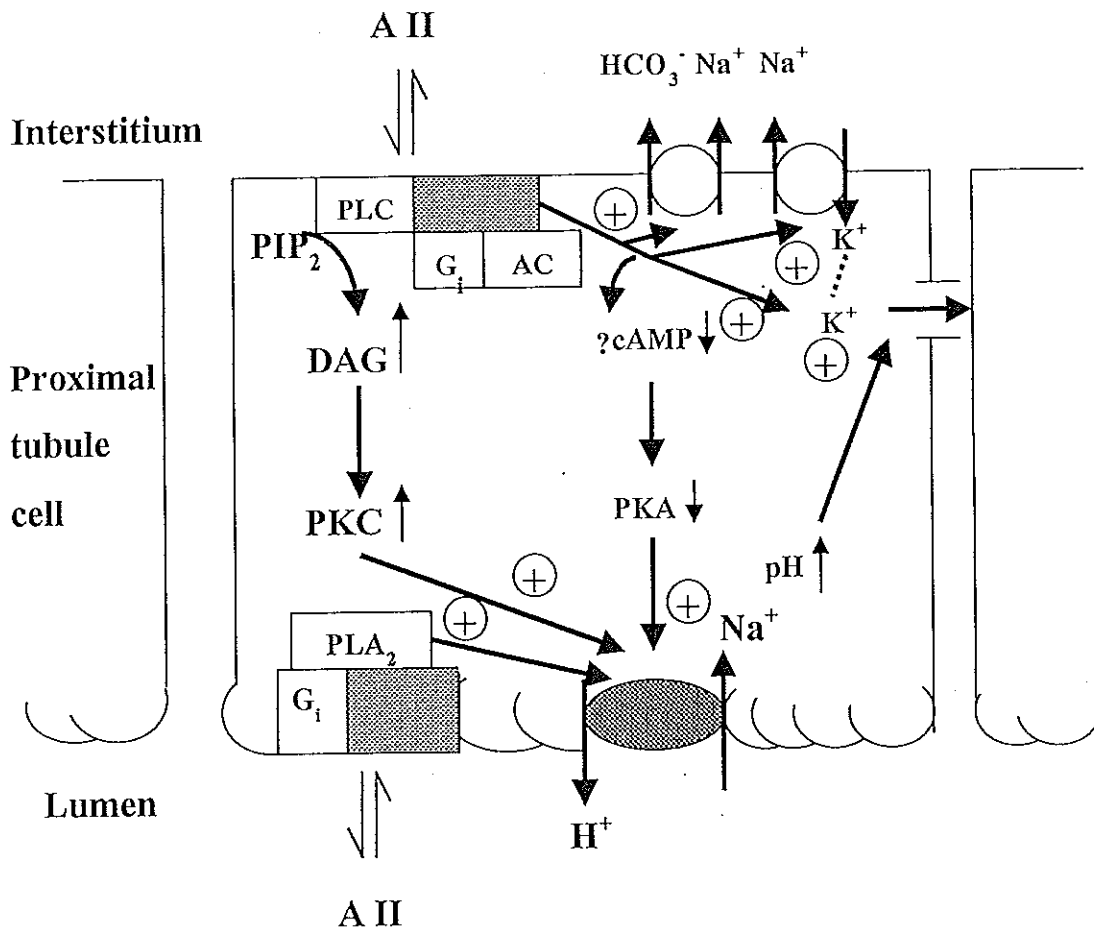
2.2.4 การออกฤทธิ์ของ angiotensin II ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal

AII มีผลโดยตรงต่อหลอดไตฝอยส่วน proximal โดย Malvin และ Vander (1967) เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่พบว่า ในหนูที่รู้สึกตัวการตอบสนองของไตต่อ AII ที่ให้ทางหลอดเลือดดำ ขึ้นกับปริมาณของ AII ที่ได้รับ โดยการให้ AII ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้การขับ sodium ทางปัสสาวะและความดันเลือดแดงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อให้ AII ในขนาดความเข้มข้นต่ำ พบว่าจะยับยั้งการขับ sodium ทางปัสสาวะ ต่อมา Barraclough และคณะ (1967) ศึกษาพบว่า AII ที่ความเข้มข้นต่ำมีผลเพิ่มการดูดกลับของเหลว โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความดันเลือด และต่อมา Johnson และ Malvin (1977) พบว่า AII ออกฤทธิ์โดยตรงที่หลอดไตฝอยส่วน proximal โดยไม่ขึ้นกับผลของ AII ที่มีต่อความดันเลือด

การออกฤทธิ์ของ AII ต่อการขนส่ง sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เป็นแบบ biphasic action กล่าวคือการใช้ AII ที่ความเข้มข้นต่ำ (10^{-12} - 10^{-9} mol l^{-1}) ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ของไตหนูมีผลกระตุ้นการดูดกลับ sodium และน้ำ ในขณะที่ให้ AII ที่ความเข้มข้นสูง (10^{-7} - 10^{-6} mol l^{-1}) จะมีผลยับยั้ง (Harris and Young, 1977) ซึ่งมีรายงานการศึกษาด้วยวิธีอื่นมากมาย ที่ให้ผลการทดลองสนับสนุนการออกฤทธิ์ดังกล่าว เช่น การใช้วิธี shrinking droplets

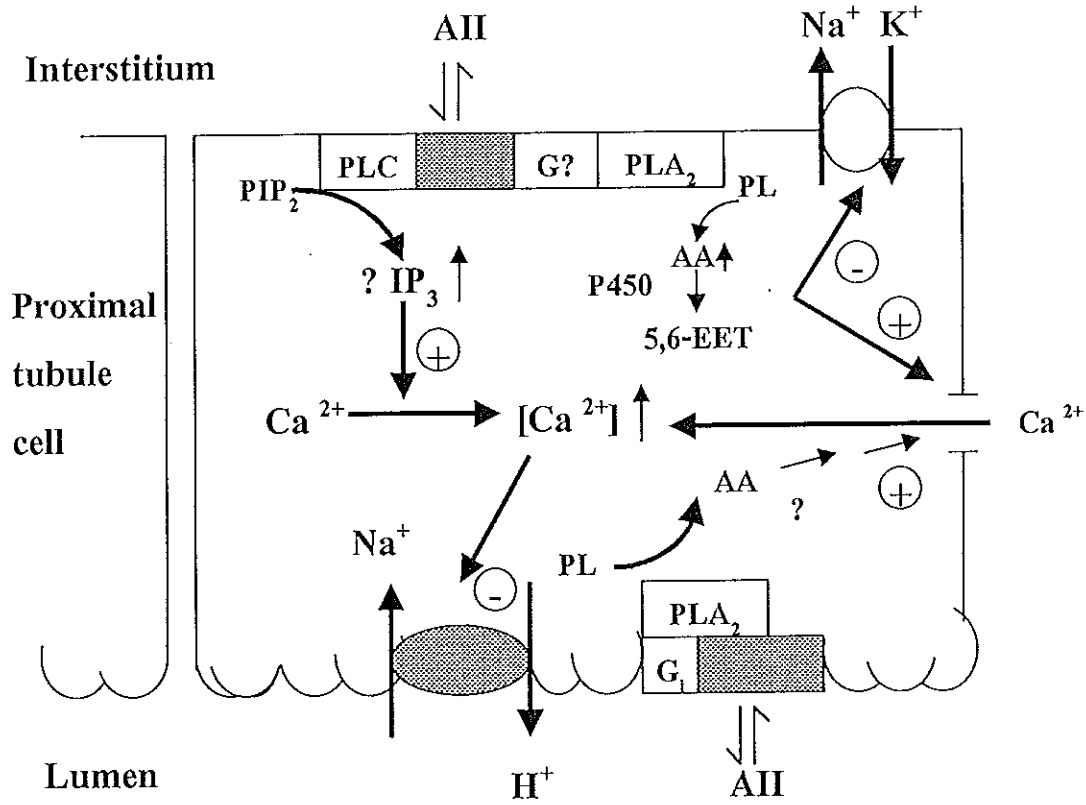
micropuncture ในหนู (Spinelli and Walther, 1979), การแยกหลอดไตฝอยส่วน proximal จากไตของกระต่าย (Schuster, et al., 1984),

กลไกการออกฤทธิ์ของ AII ที่ความเข้มข้นต่ำ (10^{-12} - 10^{-9} mol l⁻¹) ซึ่งมีผลกระตุ้นการดูดกลับ sodium บริเวณหลอดไตฝอยส่วน proximal แสดงในรูป 1.4 โดย AII ถ้าจับกับ receptor ที่ epithelium ด้าน basolateral จะมีผลไปยับยั้งเอนไซม์ adenylate cyclase ซึ่งจับอยู่กับ G-protein ทำให้ปริมาณ cAMP ภายในเซลล์ลดลง ซึ่ง cAMP นี้ปกติจะยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยน sodium กับ H⁺ (Na⁺/H⁺ exchanger) ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal ดังนั้นเมื่อปริมาณของ cAMP ภายในเซลล์ลดลงทำให้มีการแลกเปลี่ยน sodium และ H⁺ เพิ่มมากขึ้น โดย sodium จะเข้าเซลล์ส่วน H⁺ จะออกนอกเซลล์ (Douglas, et al, 1990) นอกจากนี้การใช้สารซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของ Na⁺/H⁺ exchanger เช่น amiloride จะสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ในการคัดหลั่ง H⁺ ของหลอดไตฝอยส่วน proximal ได้ (Liu and Cogan, 1988; Saccomani, et al., 1990; Wang and Chan, 1990) และ AII ที่ขนาดความเข้มข้นต่ำยังมีผลกระตุ้นความไวของ Na⁺/HCO₃⁻ (Liu and Cogan, 1988; Eiam-Ong, et al., 1993; Coppola and Fromter, 1994a; Reilly, et al, 1995) และ Na⁺, K⁺ ATPase (Garvin, 1991; Aperia, et al., 1994) ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral ร่วมกับเพิ่มการนำ potassium ในส่วนผนังเซลล์ basolateral ด้วย (Coppola and Fromter, 1994a) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ AII ซึ่งจะมีผลกระตุ้นการดูดกลับ sodium ผ่านทางการกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase C (PLC) ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสลาย phosphatidylinositol diphosphate ทำให้ได้สารที่สำคัญคือ 1,2 diacylglycerol (DAG) ไปมีผลกระตุ้น protein kinase C (PKC) และกระตุ้นการทำงานของ Na⁺/H⁺ exchanger ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal ในที่สุด สำหรับการออกฤทธิ์ของ AII ที่จับกับ AT ของ epithelium ด้าน luminal พบว่ามีผลโดยตรงในการกระตุ้นการทำงานของ Na⁺/H⁺ exchanger ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal โดยผ่านทาง G-protein และการกระตุ้น phospholipase A2 (PLA₂) (Harris, et al., 1996)



รูปที่ 1.4 ผลของฮอร์โมน angiotensin II ที่ความเข้มข้นต่ำ ($<10^{-9}$ M) ต่อการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal โดย G-protein= guanosine phosphate-binding protein; DAG= diacylglycerol; PLC= phospholipase C; PKC= protein kinase C; PIP₂= phosphatidylinositol diphosphate; PLA₂= phospholipase A₂; PKA= protein kinase A; cAMP= cyclic adenosine monophosphate; AC= adenylylcyclase (ที่มา : Harris, et al., 1996)

สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ AII ที่ความเข้มข้นสูง (10^{-7} - 10^{-6} M) มีผลยับยั้งการดูดกลับ sodium บริเวณหลอดเลือดฝอยส่วน proximal แสดงในรูป 1.5 พบว่าถ้า AII จับกับ receptor ของ epithelium ด้าน basolateral จะมีผลยับยั้งการดูดกลับ sodium ผ่านทางการกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase C (PLC) โดย PLC มีส่วนสำคัญในการสลาย phosphatidylinositol diphosphate ทำให้ได้สารที่สำคัญคือ 1,2 diacylglycerol (DAG) และ inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) ซึ่งต่อมา IP_3 นี้จะไปจับกับตัวรับที่ endoplasmic (sarcoplasmic) reticulum ทำให้มีการเคลื่อนย้าย calcium จากที่สะสมออกมา ทำให้ความเข้มข้นของ calcium ในเซลล์สูงขึ้น (Timmermans, et al., 1993) ส่งผลให้ยับยั้งการขนส่ง sodium โดย Na^+/H^+ exchange (Harris, 1992) ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal หรืออีกเส้นทางหนึ่ง AII ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลทำให้ความเข้มข้นของ calcium ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเกิดผ่านการกระตุ้น PLA_2 ให้หลั่ง arachidonic acid ซึ่งจะถูกเอนไซม์ cytochrome P-450 epoxygenase เปลี่ยนไปเป็น 5,6 epoxyeicosatrienoic acid ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+ ATPase และออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดกลับ sodium โดย Na^+/H^+ exchange จากการที่ calcium ภายนอกเคลื่อนที่เข้าในเซลล์ สำหรับการออกฤทธิ์ของ AII ที่จับกับ receptor ของ epithelium ด้าน luminal พบว่าผ่านทาง G-protein และ PLA_2 ทำให้เกิดการสร้าง arachidonic acid ซึ่งจะมีผลเพิ่มระดับ calcium ภายในเซลล์เช่นกัน (Harris, et al., 1996)



รูปที่ 1.5 ผลของฮอร์โมน angiotensin II ที่ความเข้มข้นสูง ($> 10^{-9}$ M) ต่อการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal โดย G-protein= guanosine phosphate-binding protein; PL= phospholipase; PLC= phospholipase C; PIP₂= phosphatidylinositol diphosphate; PLA₂= phospholipase A₂; IP₃ inositol triphosphate; AA= arachidonic acid (ที่มา : Harris, et al., 1996)

Geibel และคณะ (1990) พบว่าการออกฤทธิ์ของ AII จะมีต่อหลอดไตฝอย proximal ส่วน S1 มากกว่าส่วน S2 เพราะบริเวณนี้มีความสามารถในการขนส่งสารต่างๆมากกว่า และมีความหนาแน่นของ AII receptor มากกว่าบริเวณ S2 segment ถึง 10 เท่า (Liu and Cogan, 1988)

การออกฤทธิ์ของ AII ต่อการควบคุมการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal อาจเกิดผ่านทาง AT_1 หรือ AT_2 ก็ได้ จากการให้ AT_1 antagonist คือ losartan และ candesartan พบว่า AII ออกฤทธิ์ควบคุมการดูดกลับ sodium และน้ำผ่านทาง AT_1 (Leysac, et al., 1997; Wong and Edward, 1998; Smart, et al., 1999) ในขณะที่ Cogan และคณะ (1991) ศึกษาการออกฤทธิ์ของ AII ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ของไตหนูโดยใช้ AT_2 antagonist คือ PD123177 พบว่ามีผลยับยั้งการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน S1 segment ทำให้เกิดการขับทิ้ง sodium (natriuresis) และน้ำมากกว่าปกติ (diuresis) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lafayette และคณะ (1992) ในสุนัขที่สลับพบว่า PD123177 มีผลเพิ่มปริมาณของน้ำปัสสาวะ ดังนั้นการออกฤทธิ์ของ AII ต่อการควบคุมการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal อาจผ่านทาง AT_1 หรือ AT_2 ก็ได้

2.3 ผลของฮอร์โมน angiotensin II ต่อการทำงานของหลอดไตฝอยส่วน distal

2.3.1 กายวิภาคและสรีรวิทยาของหลอดไตฝอยส่วน distal

หลอดไตฝอยส่วน distal ประกอบด้วยหลอดไตฝอยส่วน medullary thick ascending limb (MTAL), cortical thick ascending lima (CTAL) และ distal convoluted tubule (DCT) โดยแต่ละส่วนมีหน้าที่แตกต่างกันไป หลอดไตฝอยส่วน MTAL มีหน้าที่คล้ายคลึงกับส่วน CTAL โดยทั้งสองส่วนนี้มี metabolism สูง จึงมีการใช้ออกซิเจนมาก และพบเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase อยู่มากทำให้มีการมีการขนส่ง sodium มาก หลอดไตฝอยส่วนนี้มีคุณสมบัติยอมให้ sodium และ chloride ผ่านได้สูง โดยมีการขนส่ง sodium และ chloride ที่หลอดไตฝอยส่วนนี้ประมาณ 15-20% ของการขนส่ง sodium ที่หลอดไตฝอยทั้งหมด ส่วนผนังเซลล์ด้าน luminal มีการขนส่งร่วม (cotransport) ซึ่งประกอบด้วยการดูดกลับ sodium, potassium อย่างละ 1 อะตอม ร่วมกับ chloride 2 อะตอม ไปพร้อมๆกัน และยังมีหน้าที่ดูดกลับสารต่างๆเช่น calcium, magnesium เป็นต้น การที่หลอดไตฝอยส่วนนี้ไม่ยอมให้น้ำซึมผ่านและมีการดูดกลับโซเดียม จึงมีผลต่อการทำให้ปัสสาวะเข้มข้น สำหรับระหว่างหลอดไตฝอยส่วน CTAL และ DCT จะเป็นส่วนของเซลล์ macula densa ทำหน้าที่ร่วมกับ afferent arteriole เรียกสองส่วนนี้ว่า juxtaglomerular apparatus มีผลควบคุมสมดุลของ sodium และระบบไหลเวียนเลือดของไต สำหรับหลอดไตฝอยส่วน DCT มีเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase อยู่มากทางผนังเซลล์ด้าน basolateral จึงมีการขนส่งสารแบบ active มาก และหลอดไตฝอย ตำแหน่งนี้ไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อฮอร์โมน aldosterone

2.3.2 การออกฤทธิ์ของฮอร์โมน angiotensin II ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน distal

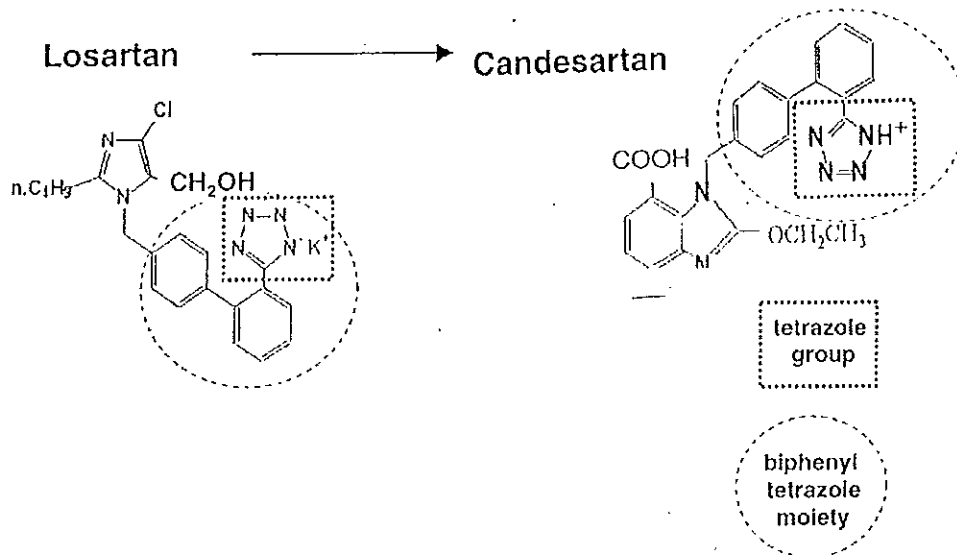
ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาผลของ AII ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน distal ดังสรุปไว้ในตาราง 1.3 ดังนี้

ตารางที่ 1.3 แสดงผลของฮอร์โมน angiotensin II ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน distal

การศึกษาที่พบ	เอกสารอ้างอิง
• ยับยั้งการขนส่ง sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน distal	Lowitz, et al., 1969
• endogenous AII มีผลกระตุ้นการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal	Rahman, et al., 1993 He, et al., 1994
• ไม่มีผลต่อการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน early distal	Fransen, et al., 1995
• กระตุ้นการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal โดยผ่านทาง Na^+/H^+ exchange	Wang and Giebisch, 1996 Mello-Aires, et al., 1997

3. candesartan

candesartan (2-ethoxy-1-([2'-(1*H*-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl]-methyl)-1*H*-benzimidazole-7-carboxylic acid) เป็น AT₁ antagonist ที่มีความจำเพาะสูง โดยพัฒนามาจาก losartan หรือ DuP753 ซึ่งเป็นสารต้นแบบ (Kobo, et al., 1993) ดังแสดงในรูป 1.6 candesartan มี half-life ประมาณ 9 ชั่วโมง และมี bioavailability ร้อยละ 40 candesartan สามารถจับกับโปรตีนใน plasma ได้ถึง ร้อยละ 98 และถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยทางปัสสาวะร้อยละ 60 นอกจากนั้นประมาณร้อยละ 40 ถูกกำจัดออกโดยทางน้ำดี (Burnier and Brunner, 1998)



รูปที่ 1.6 โครงสร้างทางเคมีของ candesartan

จากการศึกษาผลของ candesartan ต่อ mean arterial blood pressure (MABP) ในหนูปกติในภาวะ conscious หรือรู้สึกตัวพบว่า candesartan ขนาด 0.1 และ 1.0 mg kg⁻¹ มีผลลด MABP ได้เพียงเล็กน้อย (Xio and Widdop, 1996) สำหรับในหนูที่สลบ candesartan ให้ผลลด MABP ได้มากกว่าเมื่อให้ในขนาดเดียวกัน (Cervenka, et al., 1998) อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นต่ำมากคือ 0.01 mg kg⁻¹ เมื่อให้ในหนูสลบพบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลง MABP (Cervenka, et al., 1998)

สำหรับผลของ candesartan ต่อ RPF และ GFR นั้นเมื่อทดลองใน normotensive animal จะให้ผลแตกต่างกัน โดยมีทั้งรายงานที่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง RPF (Xio and Widdop, 1996), เพิ่ม RPF (Hanneke, et al., 1997; Cervenka, et al., 1998) และมีผลลด RBF (Cervenka, et al., 1998) และเช่นเดียวกันผลของ candesartan ต่อ GFR พบว่ามีรายงานผลแตกต่างกันไป โดยมีรายงานทั้งลด GFR (Cervenka, et al., 1998), เพิ่ม GFR (Cervenka, et al., 1998) และไม่มีผลเปลี่ยนแปลง (Hanneke, et al., 1997) ซึ่งผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของปริมาณสารที่ใช้, วิธีที่ให้สารสู่ร่างกาย, ระดับความรู้สึกตัวหรือยาสลบ, รูปแบบการทดลอง หรือชนิดของสัตว์ทดลอง เป็นต้น

ผลของ candesartan ต่อ urinary sodium excretion มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารที่ได้รับจากการศึกษาของ Cervenka และคณะ (1998) ในหนูปกติที่สลบพบว่า candesartan ขนาด 0.01 mg kg⁻¹ มีผลเพิ่ม urinary sodium excretion และ fractional sodium excretion ซึ่งผลนี้คาดว่าจะเกิดจากการยับยั้งการดูดกลับ sodium ของหลอดไตฝอย เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ MABP และ renal hemodynamics แต่เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 0.1 และ 1.0 mg kg⁻¹ พบว่าให้ผลลด urinary sodium excretion และ fractional sodium excretion ทั้งนี้อาจเกิดจากการลดลงของ MABP และ renal hemodynamics

4. วิธีการศึกษาการทำงานของหลอดไตฝอยส่วน proximal ในการดูดกลับ sodium และ น้ำ

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าวิธี microperfusion เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาการดูดกลับ sodium และน้ำของหลอดไตฝอยส่วน proximal โดยตรงได้ดีในสัตว์ทดลอง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในการใช้ เนื่องจากสามารถใช้ศึกษาได้เฉพาะหน่วยไตชนิด superficial เท่านั้น ไม่สามารถใช้ศึกษาในหน่วยไตชนิด juxtamedullary ซึ่งเป็นหน่วยไตที่อยู่ลึกลงไปได้ (Leysac, 1990) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้บอกการทำงานของโดยเฉลี่ยของ หลอดไตฝอยส่วน proximal ของไตทั้งหมดได้ นอกจากนี้จะต้องใช้ยาสลบและวิธีการผ่าตัดใหญ่ซึ่งอาจได้รับผลกระทบจากการผ่าตัด เช่น การสูญเสียเลือด, ของเหลว หรือเกิดภาวะ stress เป็นต้น ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถใช้ศึกษาในมนุษย์ได้

Lithium clearance เป็นวิธีที่เป็นที่ใช้ศึกษาการดูดกลับ sodium และน้ำของหลอดไตฝอยส่วน proximal ได้อีกวิธีหนึ่ง (Thomsen, 1984) ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถใช้ศึกษาการทำงานของหลอดไตฝอยส่วน proximal ของทั้งไตได้ โดย lithium ที่ฉีดเข้าในร่างกายสัตว์ทดลองยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมคือ

- 4.1 ไม่จับกับโปรตีนใน plasma ดังนั้นจึงผ่านการกรองที่ glomerulus โดยอิสระ (Thomsen, 1984)
- 4.2 lithium ถูกดูดกลับเฉพาะที่หลอดไตฝอยส่วน proximal และพบการดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วน distal น้อยมากถ้าระดับ sodium ในอาหารมีมากกว่า $50-75 \text{ mmol kg}^{-1}$ (Thomsen, and Leysac, 1986)
- 4.3 อัตราส่วนการดูดกลับ lithium ต่อ sodium และต่อน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เท่ากับ 1:1:1 (Thomsen, 1984)
- 4.4 ไม่พบการคัดหลั่ง lithium ที่หลอดไตฝอยส่วนต่างๆ (Kooman, 1989)

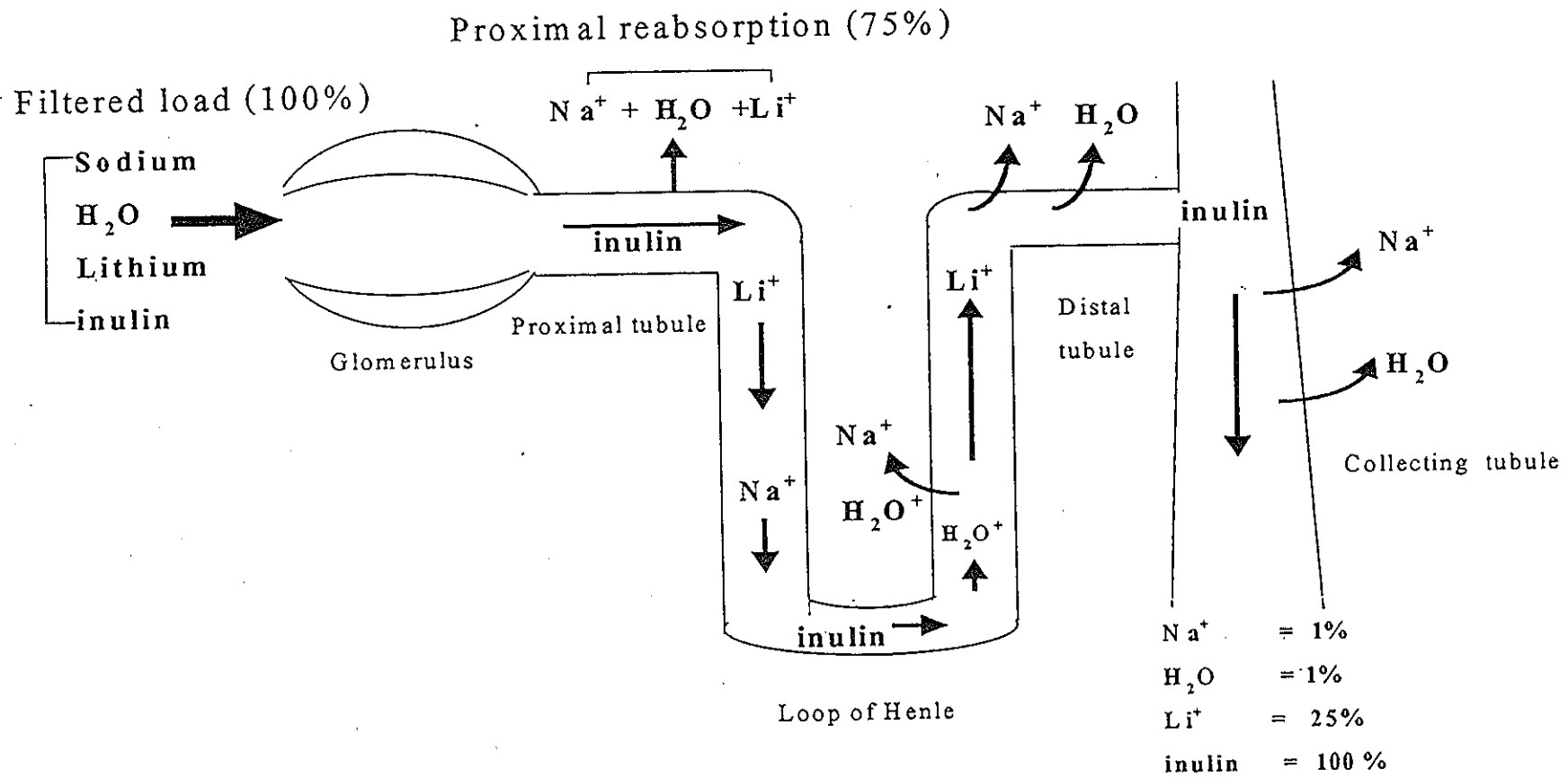
หลักการที่สำคัญของวิธี lithium clearance ที่ใช้ศึกษาการดูดกลับของ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ในหนูคือ การเพิ่มระดับ lithium ใน plasma ด้วยวิธีที่เหมาะสม, ควบคุมระดับของ lithium ใน plasma ให้คงที่ตลอดการทดลอง และให้สัตว์ทดลองได้รับอาหารที่มี sodium ขนาดมากกว่า $50-75 \text{ mmol kg}^{-1}$ เพื่อให้สามารถใช้วิธี lithium clearance ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และป้องกันผลกระทบต่อร่างกาย Shalimi และ Thomsen (1989) ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเพิ่มระดับ lithium ใน plasma ของหนู rat ที่รู้จักตัวสามวิธีด้วยกันคือ 1) ผสม lithium ในอาหารให้กินเป็นระยะเวลา 2 วันก่อนการทดลอง, 2) ให้ lithium ทางท่อทางลงสู่กระเพาะอาหารโดยตรง และ 3) ให้ lithium โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ พบว่าการเพิ่ม lithium ใน plasma โดยวิธีแรกคือผสม lithium ในอาหารและให้กินก่อนการทดลองเป็นเวลา 2 วัน สามารถรักษาระดับ lithium ใน plasma ได้ดีกว่าอีก 2 วิธี และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการดูดกลับอิเล็กโทรไลต์ของหลอดไตฝอย และด้วยวิธีดังกล่าวระดับความเข้มข้นของ lithium ใน plasma ที่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาคือ $0.2 - 0.3 \text{ mmol lit}^{-1}$

วิธี lithium clearance สามารถบอกการทำงานของหลอดไตฝอยส่วน proximal ในการดูดกลับ sodium และน้ำได้ดี โดยตำแหน่งหลักที่มีการดูดกลับ lithium คือหลอดไตฝอยส่วน proximal ซึ่งอัตรา การดูดกลับ lithium : sodium : H_2O เท่ากับ 1:1:1 ดังแสดงในรูป 1.7 การศึกษาการดูดกลับของ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ในหนู rat โดยวิธี micropuncture พบว่าให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันกับวิธี lithium clearance (Thomsen, et al., 1981; Shirley, et al., 1983) นอกจากนี้ Thomsen และ Schou (1968) ทดลองในหนูที่ได้รับ sodium ในอาหารปกติ และได้รับยาขับปัสสาวะชนิด loop diuretics คือ furosemide และ thiazides พบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า fractional lithium excretion (FE_{Li}) เช่นเดียวกับเมื่อได้รับยาขับปัสสาวะที่ออกฤทธิ์ที่หลอดไตฝอย

ส่วน distal เช่น spironolactone แต่ถ้าให้ยาขับปัสสาวะที่ออกฤทธิ์ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เช่น acetazolamide พบว่ามีผลเพิ่มค่า fractional lithium excretion (Thomsen and Schou, 1968) การทดลองเหล่านี้สนับสนุนว่าการดูดกลับ lithium เกิดขึ้นที่หลอดไตฝอยส่วน proximal

การขนส่ง lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เชื่อว่ามีกลไกผ่านทาง paracellular space (Greger, 1990) โดย lithium เมื่อผ่านการกรองที่ glomerulus แล้วจะมีการดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เนื่องจากการขนส่งทางนี้มี conductive สูง (200 mS cm^{-2}) (Fromter, 1974) และ lithium เป็นธาตุที่มีขนาดเล็ก (Fromter, 1977) กล่าวคือผนังเซลล์ด้าน luminal มีการขนส่ง Na^+/H^+ exchanger เพื่อดึง sodium จากของเหลวเข้าเซลล์ H^+ ในเซลล์จะออกไปอยู่ในของเหลวในหลอดไตฝอย และเกิดการสร้าง bicarbonate เมื่อมีการดูดกลับของ bicarbonate ไปสู่หลอดเลือดที่อยู่โดยรอบมากกว่า chloride ความเข้มข้นของ chloride ในของเหลวหลอดไตฝอยก็จะสูงขึ้นเกิด concentration gradient และเกิด electrical gradient ซึ่งจะผลักดันให้ lithium เคลื่อนผ่านบริเวณรอยต่อเข้าไปทาง paracellular space เช่นเดียวกับการเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ sodium ที่เกิดจาก electrical gradient

ระดับของ sodium ในอาหารอาจมีผลต่อการดูดกลับ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal ได้ มีรายงานว่าหนูที่ได้รับอาหารที่มี sodium ต่ำกว่า 50 mmol l^{-1} จะมีผลเพิ่มการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal โดย Boer และคณะ (1987) รายงานการศึกษาในหนูและสุนัขว่า lithium clearance มีค่าลดลงมากเมื่อ fractional sodium excretion (FE_{Na}) มีค่าต่ำกว่า 0.4 % เนื่องจากพบการดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วน distal ส่วนการศึกษาในหนู rat ที่มีภาวะ isotonic saline expansion เพื่อลดการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ร่วมกับให้ยาขับปัสสาวะ furosemide พบว่าไม่มีผลเพิ่มค่า FE_{Li} ดังนั้นแสดงว่ามีกลไกปรับตัวเกิดการดูดกลับ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal (Christensen, et al., 1988) แต่จากการศึกษาในคนพบว่าให้ผลตรงกันข้าม โดยเมื่อค่า FE_{Na} ลดลงจากการจำกัด sodium ในอาหาร จะไม่พบการดูดกลับ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน distal เพิ่มขึ้น (Boer, et al., 1987) โดยเฉพาะคนที่ได้รับอาหารที่มี sodium สูงกว่า 50 mmol day^{-1} จะไม่พบการดูดกลับ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วนนี้เลย (Bruun, et al., 1989)



รูปที่ 1.7 แสดงการขนส่ง lithium ที่หลอดไตฝอยส่วนต่างๆ ร่วมกับการขนส่ง inulin และน้ำ (ดัดแปลงจาก: Zhuo, 1990)

โดย Li⁺ = lithium ions, Na⁺ = sodium ions, H₂O = น้ำ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของ candesartan ซึ่งเป็น angiotensin II receptor antagonist ต่อความดันเลือด
แดงเฉลี่ย, การไหลเวียนเลือดที่ไต, อัตราการกรองของไต, การขับทิ้ง sodium และ potassium และ
การดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal โดยใช้วิธี lithium clearance

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแร้ทเพศผู้สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักตัวระหว่าง 250-400 กรัม จำนวน 27 ตัว จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หนูกลุ่มนี้ถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 °C ควบคุมแสงให้มีสัดส่วนระหว่างสว่าง: มืดเท่ากับ 12: 12 ชั่วโมง ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T., ประเทศไทย) และน้ำประปาโดยไม่จำกัดปริมาณ

2 ยาและสารเคมี

- 2.1 Angiotensin II, Sigma, สหรัฐอเมริกา
- 2.2 Anthrone (C₁₄H₁₀O), Fluka, สวิสเซอร์แลนด์
- 2.3 Ammonium sulfamate (H₆N₂O₃S), Fluka, สวิสเซอร์แลนด์
- 2.4 Candesartan (CV 11974, 2-ethoxy-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)bipheny-4-yl)methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid), Astra, สวีเดน
- 2.5 Heparin, LEO, เดนมาร์ก
- 2.6 Hydrochloric acid (HCl), Merck, สหรัฐอเมริกา
- 2.7 Inactin [5-ethyl-5(L-methylpropyl)-2 thiobarbituric acid], RBI, สหรัฐอเมริกา
- 2.8 Lithium chloride (LiCl), Baker, สหรัฐอเมริกา
- 2.9 Magnesium sulfate (MgSO₄) Baker, สหรัฐอเมริกา
- 2.10 N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochlorid (C₁₂H₁₆C₁₂N₂), Merck, เยอรมัน
- 2.11 Para-aminohippuric acid, sodium salt (C₉H₉N₂O₃Na), Sigma, สหรัฐอเมริกา
- 2.12 Polyfructosan, Fresenius, ออสเตรีย
- 2.13 Potassium chloride (KCl), Searle, อังกฤษ
- 2.14 Sodium carbonate (Na₂CO₃), Carlo Eaba Reagenti, สหรัฐอเมริกา
- 2.15 Sodium chloride (NaCl), Sigma, สหรัฐอเมริกา
- 2.16 Sodium hydroxide (NaOH), May and Baker, อังกฤษ

- 2.17 Sodium nitrite (NaNO_2), Montoisson, สหรัฐอเมริกา
- 2.18 Sulfuric acid (H_2SO_4), Baker, สหรัฐอเมริกา
- 2.19 Trichloroacetic acid (CCl_3COOH), Fluka, สวิตเซอร์แลนด์
- 2.20 Zinc sulphate (ZnSO_4), Baker, สหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง
2. เครื่องวัดอุณหภูมิทางทวารหนัก (electronic rectal temperature censer), Model LN 7688402, สหรัฐอเมริกา
3. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller), Model 71A, Yellow Springs, สหรัฐอเมริกา
4. เครื่องฉีดสารละลายต่อเนื่อง (infusion pump), Model 973, Harvard, สหรัฐอเมริกา
5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด, Model CC023D10ADBAAA, Avery Barkel, อังกฤษ
6. ไปเปตต์อัตโนมัติ (automatic pipettes), Eppendorf, เยอรมัน
7. เครื่องบันทึกกราฟ (polygraph), Model 7D, Grass, สหรัฐอเมริกา
8. เครื่องแปลงสัญญาณความดัน (pressure transducer), Model Statham P23XL, Grass, สหรัฐอเมริกา
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), Model CyberScan pH 2000, Eutech, สิงคโปร์
10. เครื่องเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (centrifuge), Model 4232, A.L.C., อิตาลี
11. เครื่องปั่นแยกเม็ดเลือดแดง (microhematocrit centrifuge), Model MB, IEC, สหรัฐอเมริกา
12. ท่อ polyethylene, Clay Adams, สหรัฐอเมริกา
13. เครื่องวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือแร่ (electrolyte analyzer), Model AVL ISE 988-3, ออสเตรีย
14. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณธาตุ (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer), Model Plasma 1000, สหรัฐอเมริกา
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer), Model Spectronic 21, สหรัฐอเมริกา

วิธีการวิจัย

2.1 วิธีเตรียมอาหารหนูทดลองเพื่อเพิ่มระดับ lithium ใน plasma

ให้หนูทดลองได้รับอาหารที่เพิ่ม lithium chloride (LiCl) 0.636 mg (15 mmol) ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม ก่อนวันทดลอง 2 วัน (Zhuo, 1990) ซึ่งทำโดยบดอาหารหนู 1 กิโลกรัม เติมน้ำกลั่น 150 ml และ LiCl 0.636 mg ผสมจนเข้ากันดี นำไปอบให้แห้งใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.2 การเตรียมการทดลองเพื่อศึกษาด้วยวิธี clearance

2.2.1 การเตรียมสารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ

สารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อใช้เป็น clearance markers ในการประเมินค่า glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF) และการดูดกลับของเหลวของหลอดเลือดฝอยส่วน proximal ประกอบด้วย 8% polyfructosan (PFS), 1% para-aminohippuric acid (PAH) และ LiCl 4 mmol l⁻¹ โดยสารทั้งหมดละลายใน 0.9% NaCl (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก ที่ 1)

จากการศึกษาพบว่า inulin มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้ประมาณค่า GFR ได้ และค่า clearance ของ PFS สามารถใช้แทน clearance ของ inulin ได้ ดังนั้น clearance ของ PFS สามารถใช้ประมาณค่า GFR ได้เช่นเดียวกัน (Burgend, 1965) สำหรับ clearance ของ PAH สามารถใช้ประมาณค่า RPF ได้เนื่องจากไตจะขับ PAH ออกมาทางหลอดเลือดฝอยส่วน proximal (Smith, et al., 1945)

2.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ในวันที่ทำการทดลองนำหนูมาชั่งน้ำหนัก สลับด้วย inactin ขนาด 100 mg kgbw⁻¹ ฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) และให้เพิ่มเติมน้ำระหว่างการทดลองเมื่อมีความจำเป็น นำหนูวางบนเตียงผ่าตัดและควบคุมอุณหภูมิกายทางทวารหนักให้คงที่ที่ 37°C ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิและดำเนินการผ่าตัดตามลำดับดังนี้

2.2.2.1 สอดท่อหลอดลม (tracheostomy) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-240) เพื่อช่วยในการถ่ายเทอากาศและระบายเสมหะ

2.2.2.2 สอดท่อหลอดเลือดแดง (arterial catheterization) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-50) ที่บรรจุสาร heparinized saline (1:100) สอดเข้าหลอดเลือดแดง carotid ข้างขวา แล้วต่อเข้ากับ pressure transducer เพื่อบันทึกความดันเลือดแดงด้วยเครื่อง polygraph และสำหรับเก็บตัวอย่างเลือด

2.2.2.3 สอดท่อหลอดเลือดดำ (venous catheterization) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-50) ที่บรรจุด้วยสารละลายในข้อ 2.3.2 (1) สอดเข้าหลอดเลือดดำ jugular ข้างซ้าย เพื่อฉีดสารละลายดังกล่าว และเป็นทางสำหรับให้ AII และ candesartan

2.2.2.4 สอดท่อกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder catheterization) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-200) เพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

ภายหลังการทดลอง ฆ่าสัตว์ทดลองโดยฉีดสารละลาย saturated magnesium sulfate เข้าทางหลอดเลือดดำและเปิดช่องท้องตัดไตทั้งสองข้างออกจากตัวสัตว์ และฉีกหนังหัวใจและเยื่อไขมันออกซับให้แห้ง นำไตแต่ละข้างมาชั่งน้ำหนัก

2.3 การออกแบบการทดลอง (experimental design)

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

2.3.1 กลุ่มควบคุม (control group) จำนวน 5 ตัว เป็นหนูกลุ่มที่ได้รับสารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำที่ใช้เป็น clearance markers

2.3.2 กลุ่มทดลอง (treatment group) เป็นหนูกลุ่มที่ได้รับ clearance markers และ candesartan ในปริมาณต่างๆกัน การให้ candesartan จะให้ในลักษณะ bolus injection ตามด้วย continuous infusion เป็นเวลา 60 นาที โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

2.3.2.1 กลุ่ม candesartan 0.1 mg kgbw^{-1} และ $5 \mu\text{g min}^{-1} \text{ kgbw}^{-1}$ จำนวน 7 ตัว

2.3.2.2 กลุ่ม candesartan 0.2 mg kgbw^{-1} และ $10 \mu\text{g min}^{-1} \text{ kgbw}^{-1}$ จำนวน 5 ตัว

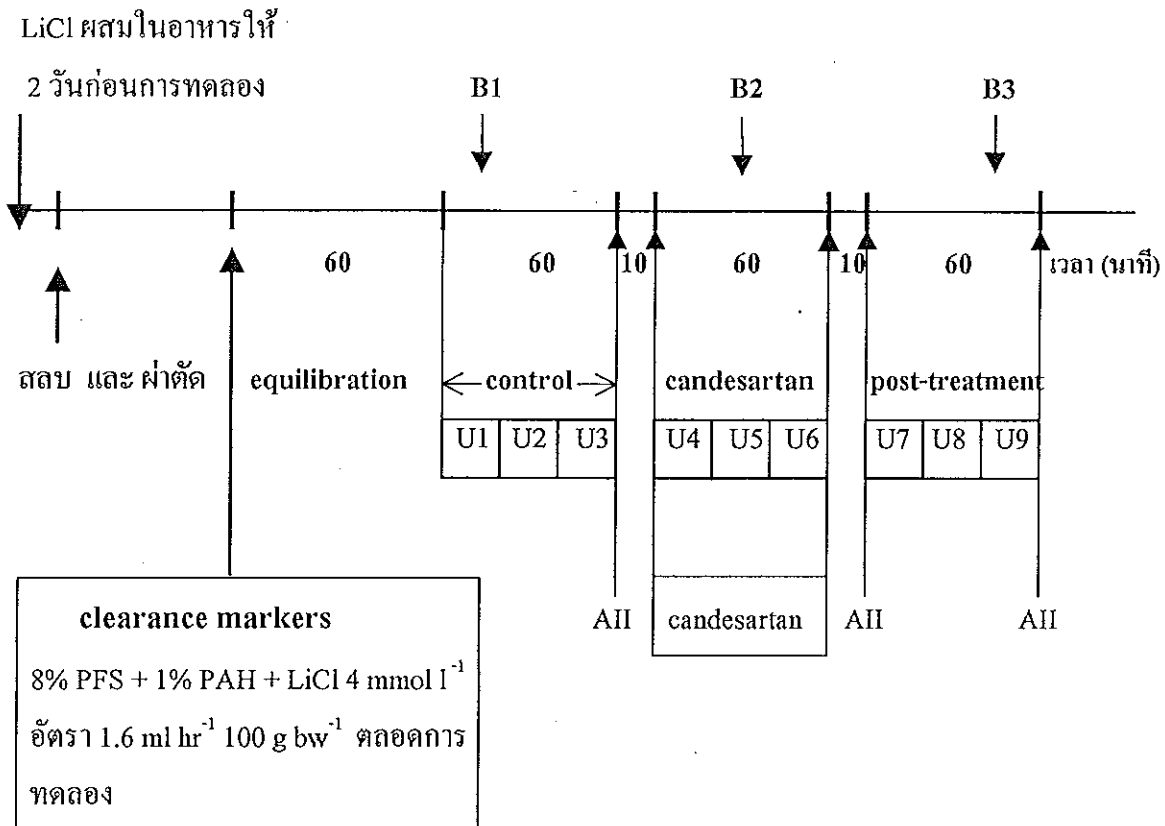
2.3.2.3 กลุ่ม candesartan 0.5 mg kgbw^{-1} และ $15 \mu\text{g min}^{-1} \text{ kgbw}^{-1}$ จำนวน 5 ตัว

2.3.2.4 กลุ่ม candesartan 1.0 mg kgbw^{-1} และ $50 \mu\text{g min}^{-1} \text{ kgbw}^{-1}$ จำนวน 5 ตัว

2.4 แผนการทดลอง (experimental protocol)

หลังจากผ่าตัดหนูทดลองดังข้อ 2.2.2 แล้ว หนูทุกกลุ่มจะได้รับสารละลายที่ประกอบด้วย clearance markers เข้าทางหลอดเลือดดำ jugular ด้วยอัตรา $1.6 \text{ ml hr}^{-1} 100 \text{ g bw}^{-1}$ ตลอดการทดลอง โดยหลังจากเสร็จสิ้นช่วงระยะเวลา equilibration (ระยะเวลา 60 นาทีหลังจากผ่าตัดสัตว์ทดลองเรียบร้อยแล้ว) จะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงเวลา ช่วงเวลาละ 60 นาที คือช่วงเวลา control, ช่วงเวลาที่ให้ candesartan และช่วงเวลา post-treatment ซึ่งเป็นช่วงหลังจากหยุดให้ candesartan แล้ว โดยช่วงเวลาระหว่าง control กับ candesartan และ candesartan กับ post-treatment จะเป็นช่วงเวลาพัก 10 นาทีเพื่อหยุดให้ยา, เปลี่ยนสารละลายในแต่ละการทดลอง และทดสอบการออกฤทธิ์ของ candesartan ว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ AII ได้หรือไม่ ซึ่งทำโดยการฉีด AII ที่ความเข้มข้น $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ ปริมาตร 0.05 ml ก่อน, หลังให้ candesartan และเมื่อสิ้นสุดการทดลองช่วง post-treatment การเก็บตัวอย่าง urine ของแต่ละช่วงเวลาการทดลองจะ

แบ่งเก็บอย่างต่อเนื่อง 3 ช่วงๆ ละ 20 นาที และการเก็บตัวอย่างเลือดจะเก็บช่วงเวลาละ 1 ครั้งๆ ละ 0.7 ml รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง (โดยเก็บในนาทีที่ 10, 30 และ 50 ของช่วงเวลา control, candesartan และ post-treatment ตามลำดับ) ใช้เลือด 20 μ l ปั้นแยกเม็ดเลือดแดงหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit, Hct) โดยใช้วิธีปั่นแยกด้วยเครื่อง microhematocrit centrifuge ส่วนเลือดที่เหลือนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge แยกเก็บเฉพาะ plasma ส่วนเม็ดเลือดแดงละลายใน 0.9% NaCl ให้ได้ปริมาตร 0.7 ml น็อคคืนกลับทางหลอดเลือดดำ jugular ตัวอย่าง plasma และ urine นี้้นำไปใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ clearance markers ต่อไป แผนการทดลองดังกล่าวแสดงไว้ในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แผนการทดลอง โดย B = การเก็บตัวอย่างเลือด, U = การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

PFS = Polyfructosan, PAH = Para-aminohippuric acid, LiCl = Lithium chloride

และ AII = Angiotensin II

2.5 วิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร (Analytical methods)

2.5.1 การหาความเข้มข้นของ sodium และ potassium

ความเข้มข้นของ sodium และ potassium ในตัวอย่าง urine และ plasma วิเคราะห์ด้วยเครื่อง electrolyte analyzer ทำโดยนำตัวอย่าง urine เจือจางใน urine diluent ตามปริมาตรที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นกับอัตราการไหลของ urine ส่วนตัวอย่าง plasma สามารถวิเคราะห์ผลได้โดยตรง

2.5.2 การหาความเข้มข้นของ polyfructosan (PFS)

การหาปริมาณความเข้มข้นของ PFS ที่มีอยู่ในตัวอย่าง urine และ plasma (ภาคผนวกที่ 1) และอ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของ PFS ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย PFS มาตรฐาน

2.5.3 การหาความเข้มข้นของ para-aminohippuric acid (PAH)

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ PAH ในตัวอย่าง urine และ plasma (ภาคผนวกที่ 2) และอ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของ PAH ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย PAH มาตรฐาน

2.5.4 การหาความเข้มข้นของ lithium ใน urine และ plasma (ภาคผนวกที่ 3)

เจือจางตัวอย่าง urine และ plasma ด้วย lithium diluent วิเคราะห์หาปริมาณ lithium ด้วยเครื่อง inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer (ICP-AES) ที่ช่วงคลื่น 670.8 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ lithium ในตัวอย่าง urine และ plasma สามารถประมาณได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับ emission counts ของสารละลาย lithium มาตรฐาน

การคำนวณ (Calculations)

ค่า clearance ของสารใดๆ (X) สามารถคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

C_x	= $[U_x] \times V / [P_x]$	หน่วยเป็น	$ml \text{ min}^{-1}$
$[U_x]$	= ความเข้มข้นของสาร X ใน urine	"	$mg\%$
$[P_x]$	= ความเข้มข้นของสาร X ใน plasma	"	$mg\%$
V	= urine flow rate	"	$ml \text{ min}^{-1}$

ส่วน clearance ของ PAH ใช้ประมาณค่า effective renal plasma flow (ERPF) แต่เนื่องจากมี plasma บางส่วนที่ไม่ผ่าน glomeruli และบางส่วนผ่านไปยังเนื้อเยื่อไตที่ไม่มีการคัดหลัง PAH ดังนั้น extraction ratio ของ PAH = 0.9 ดังนั้นในการคำนวณค่าประมาณของ total renal plasma flow (TRPF) จึงเท่ากับ $ERPF/0.9 \text{ ml min}^{-1}$ โดยในการทดลองครั้งนี้จะใช้ตัวย่อ TRPF เป็น RPF

สำหรับอัตราส่วนการขับทิ้ง (FE) ของสารใดๆ (X) สามารถคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$FE_{(X)} = [(U_x \times V/P_x) / C_{PFS}] \times 100 \quad \text{หน่วยเป็น } \%$$

การดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal (fractional proximal sodium reabsorption, FPR_{Na}) สามารถประมาณได้จากค่าการดูดกลับของ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal (fractional lithium reabsorption, FR_{Li}) เนื่องจากพบว่า lithium จะถูกดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เท่านั้น (Thomsen, 1984) และคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$FPR_{Na} = (C_{PFS} \times P_{Li}) - (U_{Li} \times V) / (C_{PFS} \times P_{Li}) \times 100 \quad \text{หน่วยเป็น } \%$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่างๆจากการทดลองจะนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดเฉลี่ยมาตรฐาน (mean และ S. E. M.) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยต่างๆของช่วงเวลา control ระหว่างกลุ่มด้วย one way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยภายในกลุ่มโดยใช้ two way ANOVA และเมื่อทราบว่ามีความแตกต่างภายในกลุ่มการทดลองทั้งหมด ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Student-Newmen Keuls post hoc test โดยจะยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า P value < 0.05

3. ผลการทดลอง

3.1 Time control experiment

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า mean arterial blood pressure (MABP), hematocrit (Hct), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (V), plasma sodium and potassium (P_{Na} และ P_K), urinary excretion of sodium and potassium ($U_{Na}V$ และ U_KV), fractional sodium and potassium excretion (FE_{Na} และ FE_K), plasma lithium (P_{Li}), lithium clearance (C_{Li}), fractional lithium excretion (FE_{Li}), และค่า fractional proximal reabsorption of sodium (FPR_{Na}) ในหนูกลุ่มควบคุมตลอด 3 ช่วงเวลาของการทดลอง ช่วงแรกคือนาทีที่ 0-60, ช่วงที่สองคือนาทีที่ 70-130 และ ช่วงที่สามคือนาทีที่ 140-200 พบว่าค่าเฉลี่ยของทุก parameter ทั้งสามช่วงเวลาไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.2 ผลของ candesartan ต่อ mean arterial blood pressure (MABP)

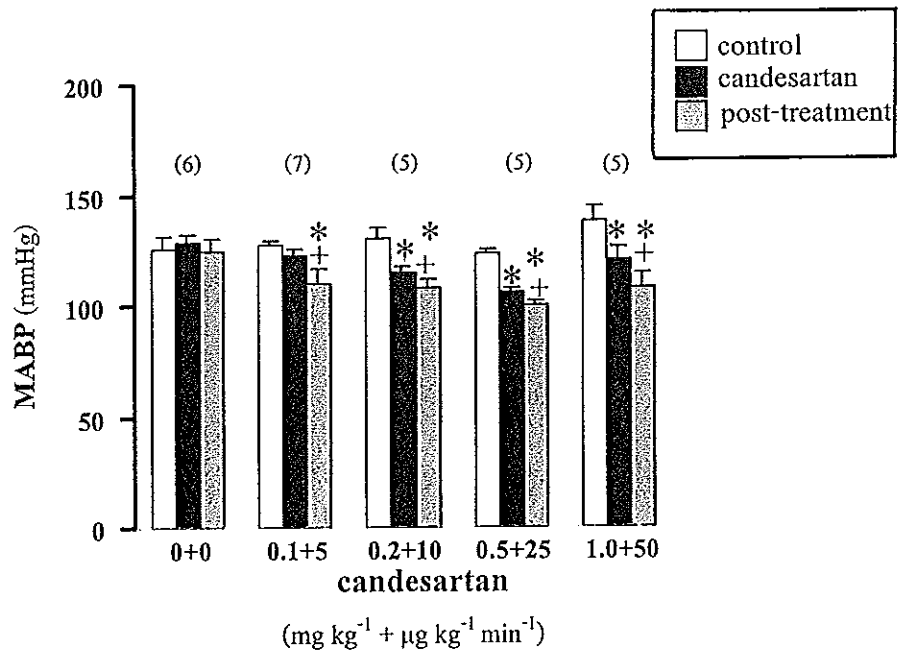
รูปที่ 3.1 และตารางที่ 1 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อ MABP พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ขนาด $0.1 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ MABP ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือจาก 127.5 ± 2.0 เป็น $122.1 \pm 3.4 \text{ mmHg}$ แต่หลังจากหยุดให้ candesartan (ช่วงเวลา post-treatment) MABP มีค่า $110.0 \pm 6.5 \text{ mmHg}$ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control สำหรับกลุ่มที่ได้รับ candesartan ขนาด $0.2 + 10, 0.5 + 25$ และ $1.0 + 50 \text{ mg kg}^{-1} + \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ พบว่า MABP มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือลดลงจาก 130.4 ± 4.6 เป็น 114.3 ± 2.9 และ 123.3 ± 2.2 เป็น 106.2 ± 2.0 และ 138.2 ± 6.0 เป็น $120.6 \pm 5.3 \text{ mmHg}$ ตามลำดับ ส่วนในช่วงเวลา post-treatment พบว่า MABP ยังคงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเหลือเพียง $107.0 \pm 4.0, 99.8 \pm 1.8$ และ $108.1 \pm 6.1 \text{ mmHg}$ ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์ของ candesartan ในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ผ่านตัวรับ AT_1 ด้วยการ bolus AII ที่ความเข้มข้น $10^{-6} \text{ mmol l}^{-1}$ ปริมาตร 0.05 ml ในหนูทุกกลุ่ม โดยให้ก่อนและหลังช่วงเวลา candesartan รวมทั้งหลังสิ้นสุดช่วงเวลา post-treatment พบว่าก่อนช่วงเวลา candesartan หนูทุกกลุ่มมีการเพิ่มขึ้นของ MABP ประมาณ 50 mmHg เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที ในขณะที่ภายหลังหยุดให้ candesartan และหลังสิ้นสุดช่วงเวลา post-treatment หนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ทุกขนาดไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ MABP สำหรับกลุ่มควบคุมพบว่า MABP มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 50 mmHg เป็นเวลา 2-3 นาที ทั้ง 3 ช่วงที่ได้รับ AII

ตารางที่ 3.1 Time control experiment แสดงค่า mean arterial blood pressure (MABP), hematocrit (Hct), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (V), plasma sodium and potassium (P_{Na} และ P_K), urinary excretion of sodium and potassium ($U_{Na}V$ และ U_KV), fractional sodium and potassium excretion (FE_{Na} และ FE_K), plasma lithium (P_{Li}), lithium clearance (C_{Li}), fractional lithium excretion (FE_{Li}), และค่า fractional proximal reabsorption of sodium (FPR_{Na}) ของหนูกลุ่มควบคุม (n=5)

	นาทีที่			P value
	0-60	70-130	140-200	
MABP (mmHg)	125.4 ± 6.0	127.8 ± 3.9	120.6 ± 5.6	NS
Hct (%)	45.9 ± 0.8	45.0 ± 0.8	44.4 ± 0.8	NS
P_{PFS} (mg%)	99.7 ± 4.7	97.2 ± 3.4	97.6 ± 3.9	NS
P_{PAH} (mg%)	1.09 ± 0.9	0.99 ± 0.07	1.00 ± 0.02	NS
GFR ($ml\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	1.27 ± 0.03	1.22 ± 0.09	1.29 ± 0.12	NS
RPF ($ml\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	3.95 ± 0.22	3.86 ± 0.26	3.72 ± 0.25	NS
FF (%)	32.6 ± 4	31.0 ± 2	33.8 ± 2	NS
V ($\mu l\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	20.0 ± 7	24.4 ± 4	19.6 ± 5	NS
P_{Na} ($mmol\ l^{-1}$)	142.0 ± 0.25	143.2 ± 0.6	142.8 ± 0.55	NS
$U_{Na}V$ ($\mu mol\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	3.22 ± 0.3	3.78 ± 0.1	3.32 ± 0.6	NS
FE_{Na} (%)	1.94 ± 0.3	2.29 ± 0.2	1.92 ± 0.3	NS
P_K ($mmol\ l^{-1}$)	3.7 ± 0.55	3.7 ± 0.13	3.55 ± 0.04	NS
U_KV ($\mu mol\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	0.64 ± 0.6	0.64 ± 0.06	0.58 ± 0.09	NS
FE_K (%)	12.63 ± 0.8	14.85 ± 1.2	12.52 ± 1.4	NS
P_{Li} ($mmol\ l^{-1}$)	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.3 ± 0.01	NS
C_{Li} ($ml\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	0.383 ± 0.02	0.388 ± 0.05	0.377 ± 0.04	NS
FE_{Li} (%)	31.5 ± 0.9	33.8 ± 2.2	32.7 ± 2.2	NS
FPR_{Na} (%)	68.0 ± 1.1	65.1 ± 2.7	67.3 ± 2.2	NS

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M., NS = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



รูปที่ 3.1 ค่า mean arterial blood pressure (MABP) ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)

+ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา candesartan ($P < 0.05$)

3.3 ผลของ candesartan ต่อ renal plasma flow (RPF)

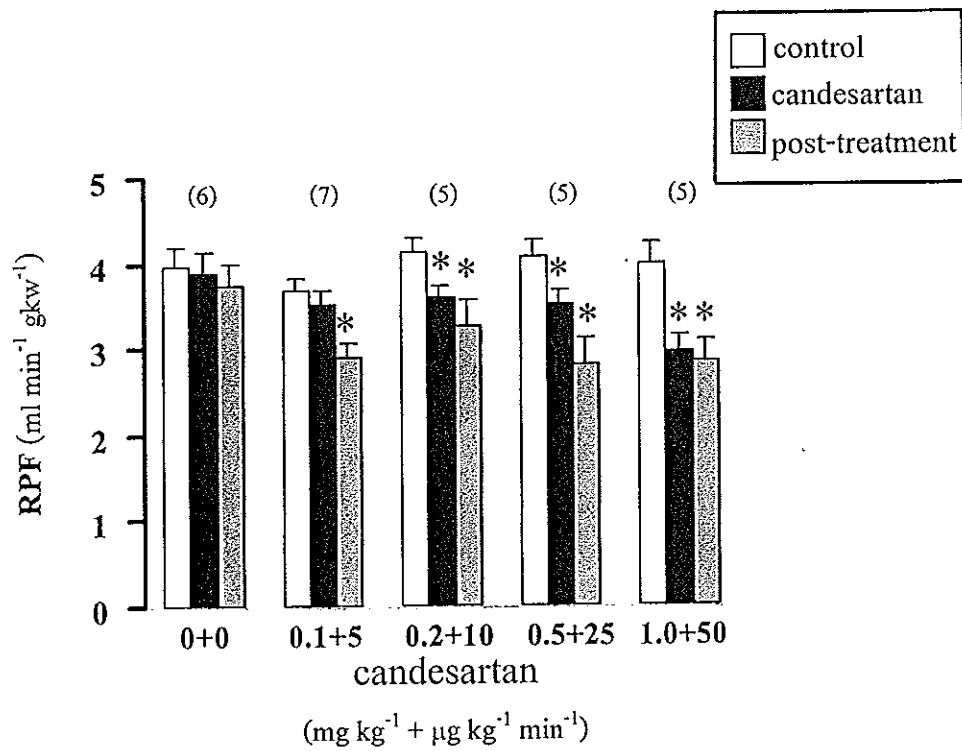
รูปที่ 3.2 และตารางที่ 1 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อ RPF พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ขนาด $0.1 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ค่า RPF ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control แต่ในช่วงเวลา post-treatment RPF มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือลดลงจาก 3.6 ± 0.1 เป็น $2.9 \pm 0.2 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$) สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ที่ขนาด $0.2 + 10, 0.5 + 25$ และ $1.0 + 50 \text{ mg kg}^{-1} + \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ พบว่า RPF มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือลดลงจาก 4.1 ± 0.2 เป็น 3.6 ± 0.1 และจาก 4.0 ± 0.2 เป็น 3.5 ± 0.2 และจาก 3.9 ± 0.2 เป็น $2.9 \pm 0.2 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$ ตามลำดับ ส่วนในช่วงเวลา post-treatment RPF ยังคงมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเหลือเพียง $3.2 \pm 0.3, 2.8 \pm 0.3$ และ $2.8 \pm 0.2 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$ ตามลำดับ

3.4 ผลของ candesartan ต่อ glomerular filtration rate (GFR)

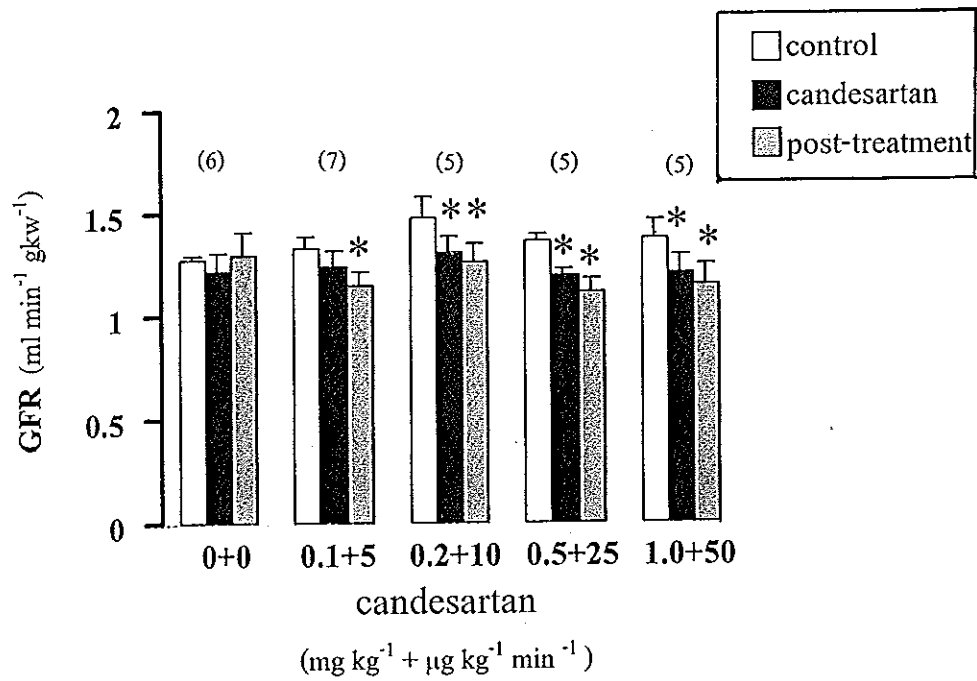
รูปที่ 3.3 และตารางที่ 1 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อ GFR พบว่า candesartan ในขนาด $0.1 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า GFR เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control แต่ในช่วงเวลา post-treatment GFR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือลดลงเป็น $1.15 \pm 0.07 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$ สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ในขนาด $0.2 + 10, 0.5 + 25$ และ $1.0 + 50 \text{ mg kg}^{-1} + \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ พบว่า GFR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือลดลงจาก 1.4 ± 0.09 เป็น 1.3 ± 0.08 และจาก 1.4 ± 0.04 เป็น 1.2 ± 0.02 และจาก 1.4 ± 0.09 เป็น $1.2 \pm 0.09 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$ ตามลำดับ ส่วนในช่วงเวลา post-treatment GFR ยังคงมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือลดลงเป็น $1.2 \pm 0.09, 1.1 \pm 0.06$ และ $1.1 \pm 0.1 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$ ตามลำดับ

3.5 ผลของ candesartan ต่อ filtration fraction (FF)

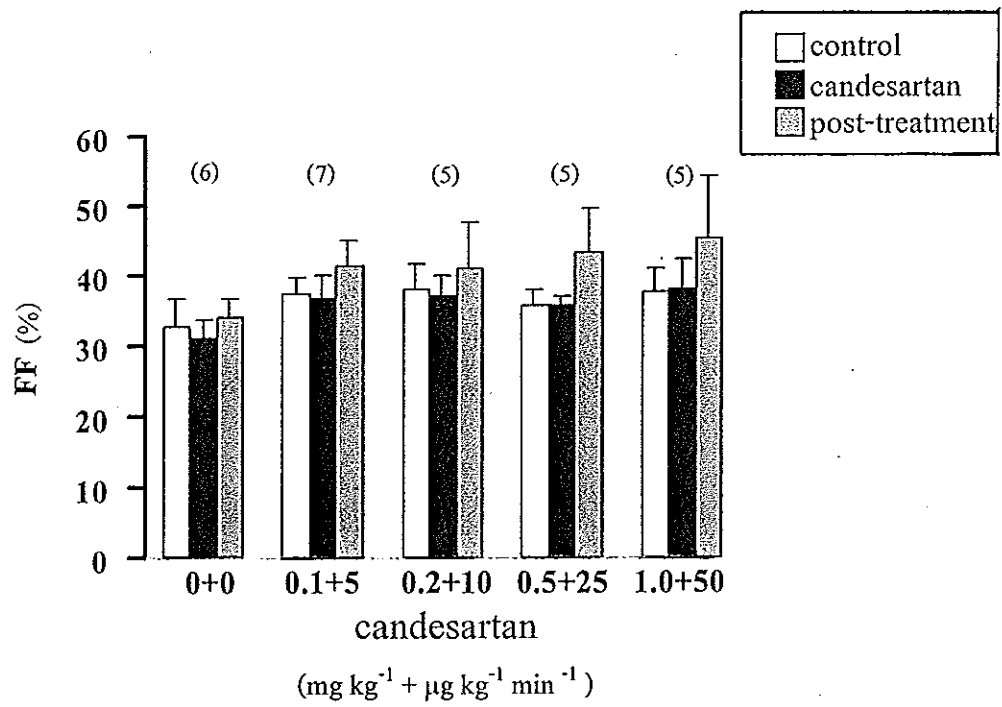
รูปที่ 3.4 และตารางที่ 1 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อ filtration fraction (FF) พบว่าค่า FF ของหนูทุกกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งสามช่วงเวลา



รูปที่ 3.2 ค่า renal plasma flow (RPF) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan
 ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม
 * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)



รูปที่ 3.3 ค่า glomerular filtration rate (GFR) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control (P < 0.05)



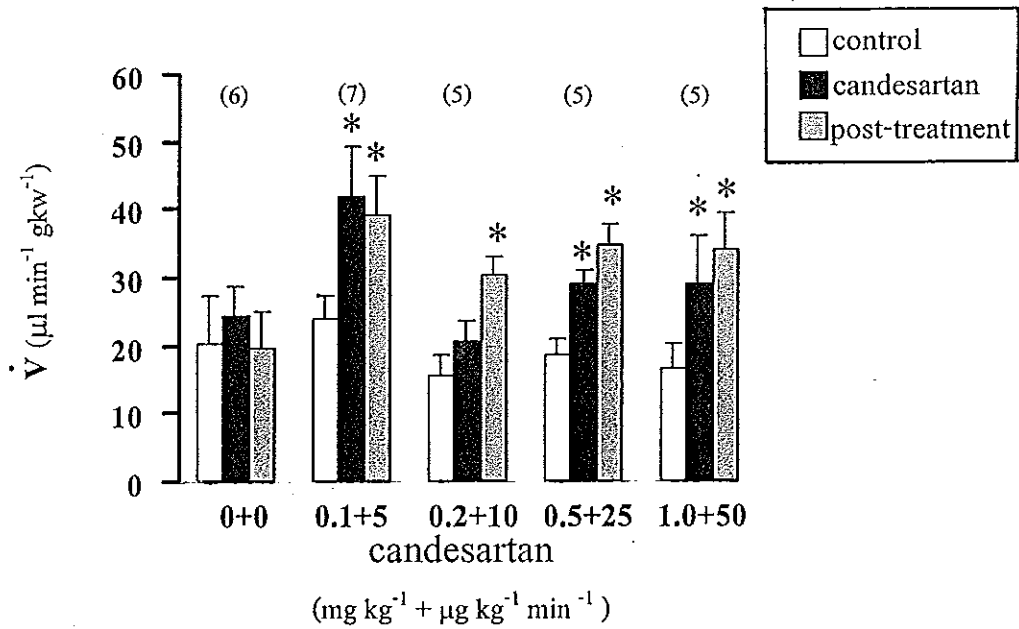
รูปที่ 3.4 ค่า filtration fraction (FF) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan
ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม

3.6 ผลของสาร candesartan ต่อ urine flow rate (V)

รูปที่ 3.5 และตารางที่ 3 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อ urine flow rate พบว่า ขณะที่ได้รับ candesartan ขนาด 0.1+5, 0.5+25 และ 1.0+50 mg kg⁻¹ + µg kg⁻¹ min⁻¹ urine flow rate มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเพิ่มจาก 23.9 ± 3.2 เป็น 41.6 ± 7.6 จาก 18.5 ± 2.5 เป็น 28.8 ± 2.2 µl min⁻¹ gkw⁻¹ และจาก 16.4 ± 3.7 เป็น 29.1 ± 6.8 µl min⁻¹ gkw⁻¹ ตามลำดับ ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ candesartan ขนาด 0.2 mg kg⁻¹ + 10 µg kg⁻¹ min⁻¹ urine flow rate มีค่าไม่แตกต่างจาก control สำหรับช่วงเวลา post-treatment พบว่าหนูทุกกลุ่มมีค่า urine flow rate เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเพิ่มเป็น 39.1 ± 5.5 เป็น 30.4 ± 2.6, 34.8 ± 2.8 และ 34.1 ± 5.3 µl min⁻¹ gkw⁻¹ ตามลำดับ

3.7 ผลของ candesartan ต่อ urinary sodium excretion (U_{Na}V) และ fractional sodium excretion (FE_{Na})

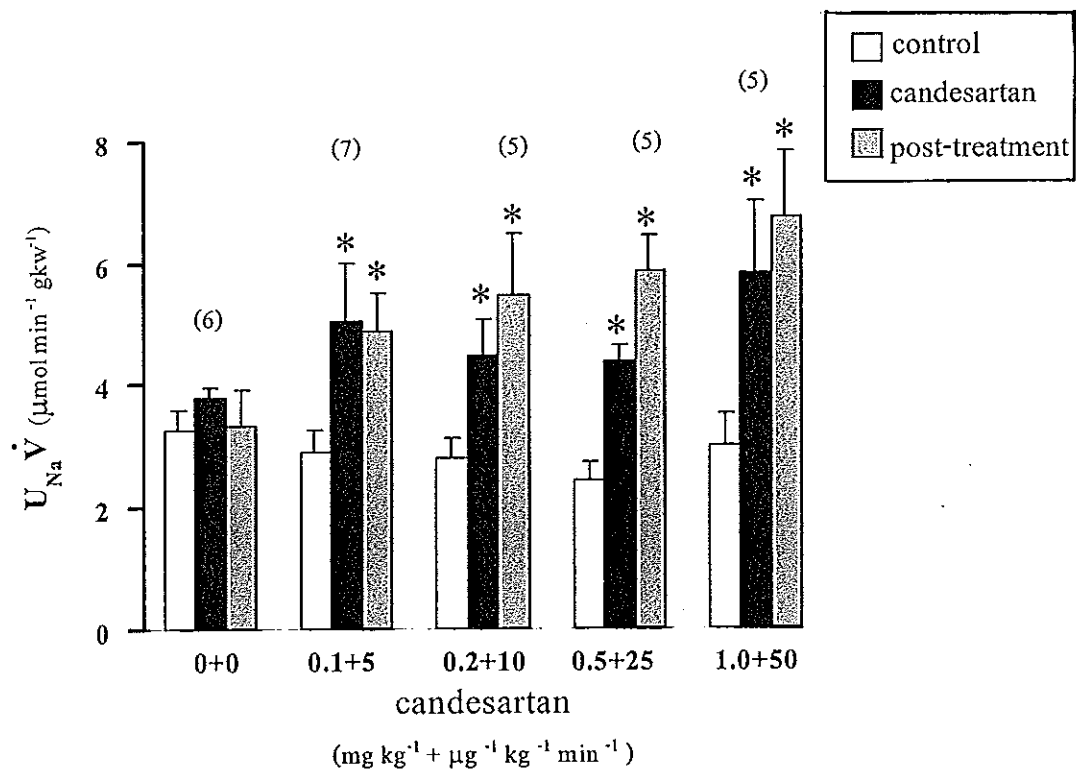
รูปที่ 3.6 และตารางที่ 2 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อ U_{Na}V และ FE_{Na} พบว่าหนูทุกกลุ่มมีค่า U_{Na}V เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเพิ่มจาก 2.80 ± 0.36 เป็น 5.03 ± 0.93 จาก 2.78 ± 0.3 เป็น 4.47 ± 0.58 จาก 2.4 ± 0.2 เป็น 4.4 ± 0.2 และจาก 2.9 ± 0.5 เป็น 5.8 ± 1.2 µmol min⁻¹ gkw⁻¹ ตามลำดับ ส่วนค่า FE_{Na} ให้ผลเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน คือเพิ่มจาก 1.49 ± 0.2 เป็น 2.75 ± 0.6 จาก 1.26 ± 0.1 เป็น 2.4 ± 0.2 จาก 1.22 ± 0.09 เป็น 2.52 ± 0.2 และจาก 1.50 ± 0.2 เป็น 3.40 ± 0.5 % ตามลำดับ สำหรับในช่วง post-treatment พบว่าค่า U_{Na}V และ FE_{Na} ของทุกกลุ่มยังคงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือค่า U_{Na}V เพิ่มเป็น 4.86 ± 0.6, 5.45 ± 0.44, 5.84 ± 0.6 และ 6.74 ± 1.1 µmol min⁻¹ gkw⁻¹ ตามลำดับ ส่วนค่า FE_{Na} เพิ่มเป็น 2.80 ± 0.4, 3.23 ± 0.1, 3.62 ± 0.2 และ 3.93 ± 0.4 ตามลำดับ



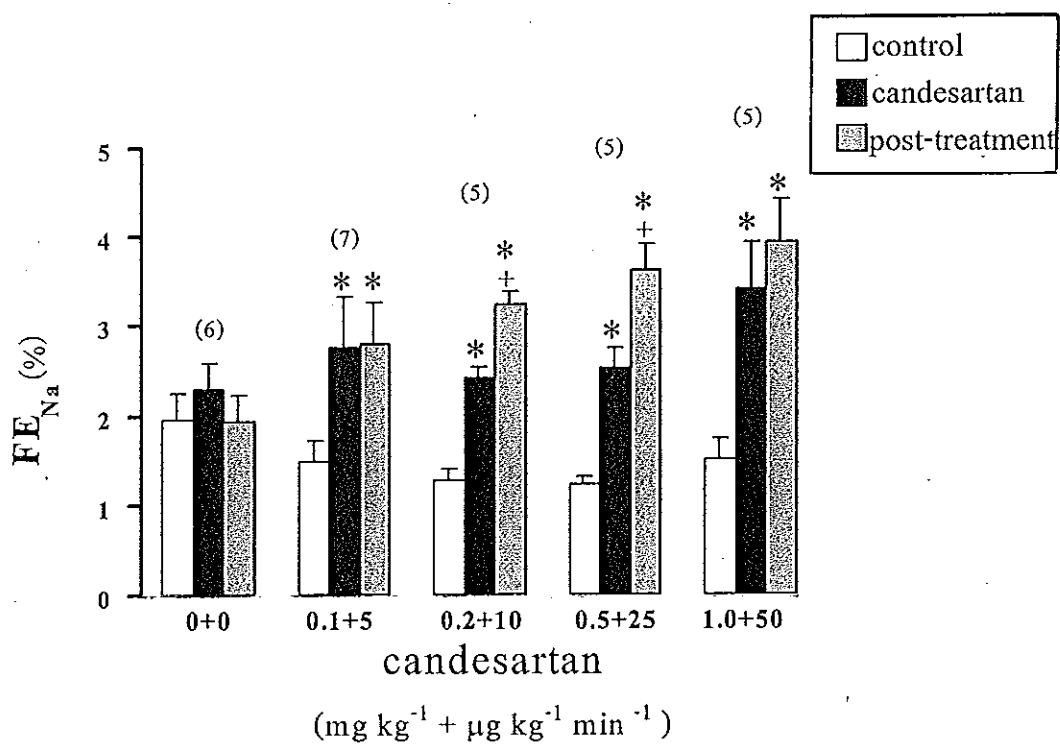
รูปที่ 3.5 ค่า urine flow rate (\dot{V}) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan

ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)



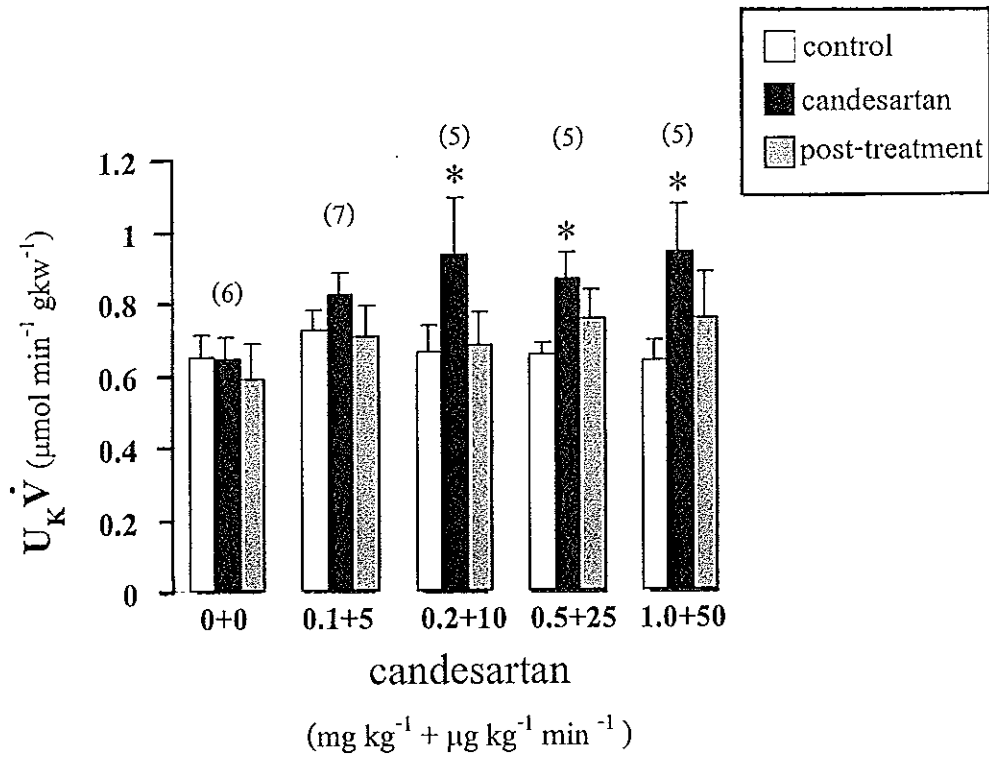
รูปที่ 3.6 ค่า urinary sodium excretion ($U_{Na}V$) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)



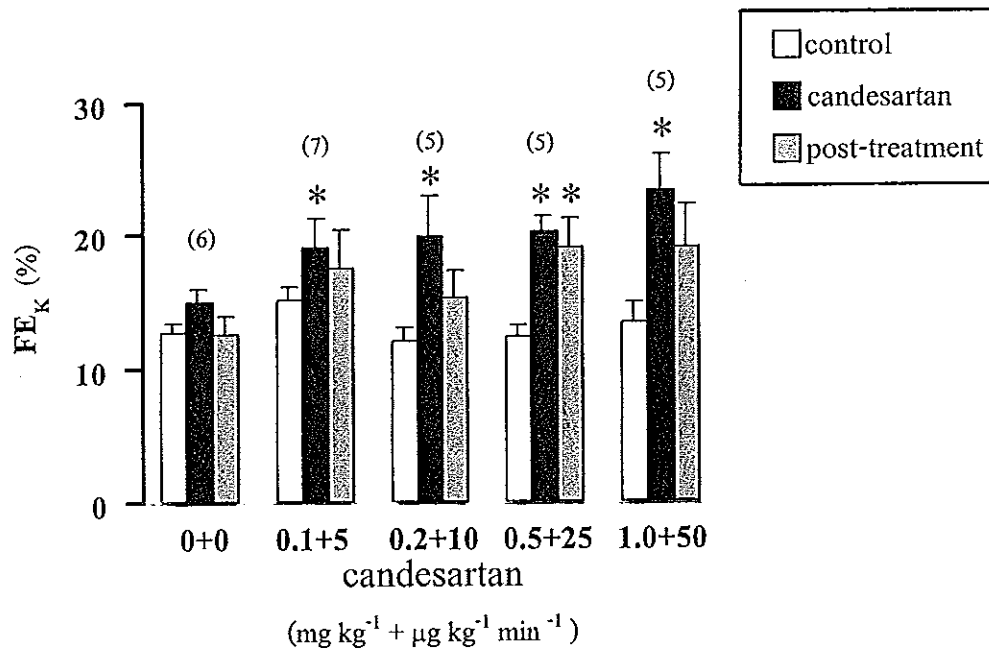
รูปที่ 3.7 ค่า fractional sodium excretion (FE_{Na}) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม
 * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)
 + แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา candesartan ($P < 0.05$)

3.8 ผลของ candesartan ต่อ urinary potassium excretion (U_KV) และ fractional potassium excretion (FE_K)

จากรูปที่ 3.8 และตารางที่ 2 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อ U_KV และ FE_K ซึ่งเมื่อให้ในขนาด $0.1 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ค่า U_KV ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control สำหรับกลุ่มที่ได้รับ candesartan ขนาดสูงขึ้นเป็น $0.2+10$, $0.5+25$, $1.0+50 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ พบว่า U_KV มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเพิ่มจาก 0.66 ± 0.07 เป็น 0.93 ± 0.2 จาก 0.65 ± 0.03 เป็น 0.86 ± 0.07 และจาก 0.64 ± 0.06 เป็น $0.94 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในช่วงเวลา post-treatment พบว่าค่า U_KV ของหนูทุกกลุ่มมีค่าไม่ต่างจาก control ส่วนผลของ candesartan ต่อ FE_K ดังแสดงผลที่รูป 3.9 พบว่าหนูที่ได้รับ candesartan ทุกกลุ่ม FE_K มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเพิ่มจาก 15.0 ± 1.2 เป็น 19.0 ± 2.2 จาก 1.2 ± 0.8 เป็น 19.9 ± 2.9 จาก 12.3 ± 0.8 เป็น 20.2 ± 1.2 และจาก 13.4 ± 1.5 เป็น $23.2 \pm 2.8 \%$ ตามลำดับ แต่เมื่อหยุดให้ candesartan พบว่า FE_K มีค่าไม่ต่างจากช่วงเวลา control ยกเว้นหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ขนาด $0.5 \text{ mg kg}^{-1} + 25 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ซึ่งยังคงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ $19.0 \pm 2.2 \%$



รูปที่ 3.8 ค่า urinary potassium excretion ($U_K V$) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)



รูปที่ 3.9 ค่า fractional potassium excretion (FE_K) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม

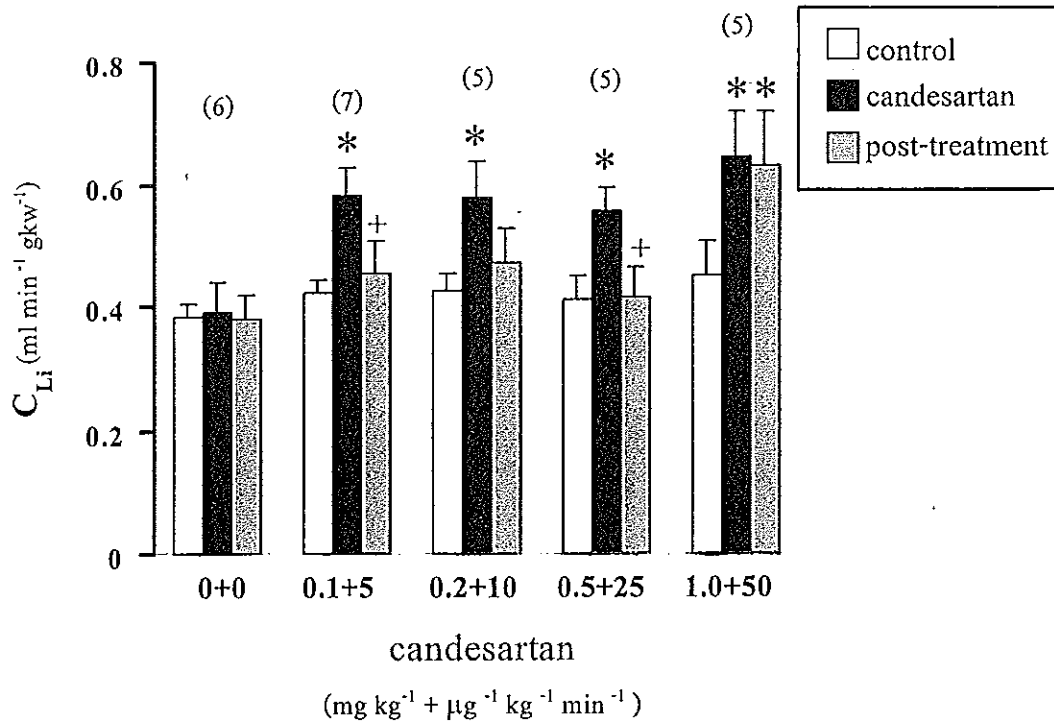
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)

3.10 ผลของสาร candesartan ต่อค่า lithium clearance (C_{Li}), fractional lithium excretion (FE_{Li}) และ fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na})

รูปที่ 3.10 และตารางที่ 3 (ภาคผนวกที่ 4) แสดงผลของ candesartan ต่อค่า C_{Li} พบว่าหนูทุกกลุ่มมีค่า C_{Li} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเพิ่มจาก 0.42 ± 0.02 เป็น 0.58 ± 0.04 จาก 0.42 ± 0.02 เป็น 0.58 ± 0.06 จาก 0.40 ± 0.04 เป็น 0.56 ± 0.04 และจาก 0.45 ± 0.06 เป็น $0.64 \pm 0.08 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$ ตามลำดับ แต่ในช่วงเวลา post-treatment พบว่า C_{Li} มีค่าไม่แตกต่างจากช่วงเวลา control ยกเว้นหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ขนาดสูงสุดคือ $1.0 \text{ mg kg}^{-1} + 50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ซึ่งยังคงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือเพิ่มเป็น $0.63 \pm 0.08 \text{ ml min}^{-1} \text{ gkw}^{-1}$

สำหรับ FE_{Li} พบว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่า FE_{Li} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 3.11 และตารางที่ 3 (ภาคผนวกที่ 4) คือเพิ่มจาก 32.4 ± 1.6 เป็น 46.7 ± 1.8 จาก 28.7 ± 1.6 เป็น 43.6 ± 1.9 จาก 29.4 ± 1.8 เป็น 46.4 ± 2.5 และจาก 32.2 ± 2.2 เป็น $54.2 \pm 3.4 \%$ ตามลำดับ แต่ในช่วงเวลา post-treatment พบว่าค่า FE_{Li} ไม่แตกต่างจากช่วงเวลา control ยกเว้นหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan ความเข้มข้น $1.0+50 \text{ mg kg}^{-1} + \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ พบว่า FE_{Li} ยังคงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือเพิ่มเป็น $52.2 \pm 4.7 \%$

จากการนำค่า lithium clearance มาคำนวณเป็นค่า FPR_{Na} (ตามที่ใ้กล่าวไว้ในวิธีการทดลอง) พบว่าหนูทดลองทุกกลุ่มที่ได้รับ candesartan FPR_{Na} มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control (รูปที่ 3.12 และตารางที่ 3 จากภาคผนวกที่ 4) คือลดลงจาก 67.6 ± 1.6 เป็น 53.2 ± 1.8 จาก 71.2 ± 1.6 เป็น 56.4 ± 1.9 จาก 70.6 ± 1.8 เป็น 53.5 ± 2.5 และจาก 67.8 ± 2.2 เป็น $47.2 \pm 3.6 \%$ ตามลำดับ แต่ในช่วงเวลา post-treatment พบว่าค่า FPR_{Na} ไม่แตกต่างจากช่วงเวลา control ยกเว้นที่ความเข้มข้น $0.5+25$ และ $1.0+50 \text{ (mg kg}^{-1} + \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1})$ ค่า FPR_{Na} ยังคงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control คือลดลง 64.1 ± 2.2 และ $49.8 \pm 3.4 \%$ ตามลำดับ

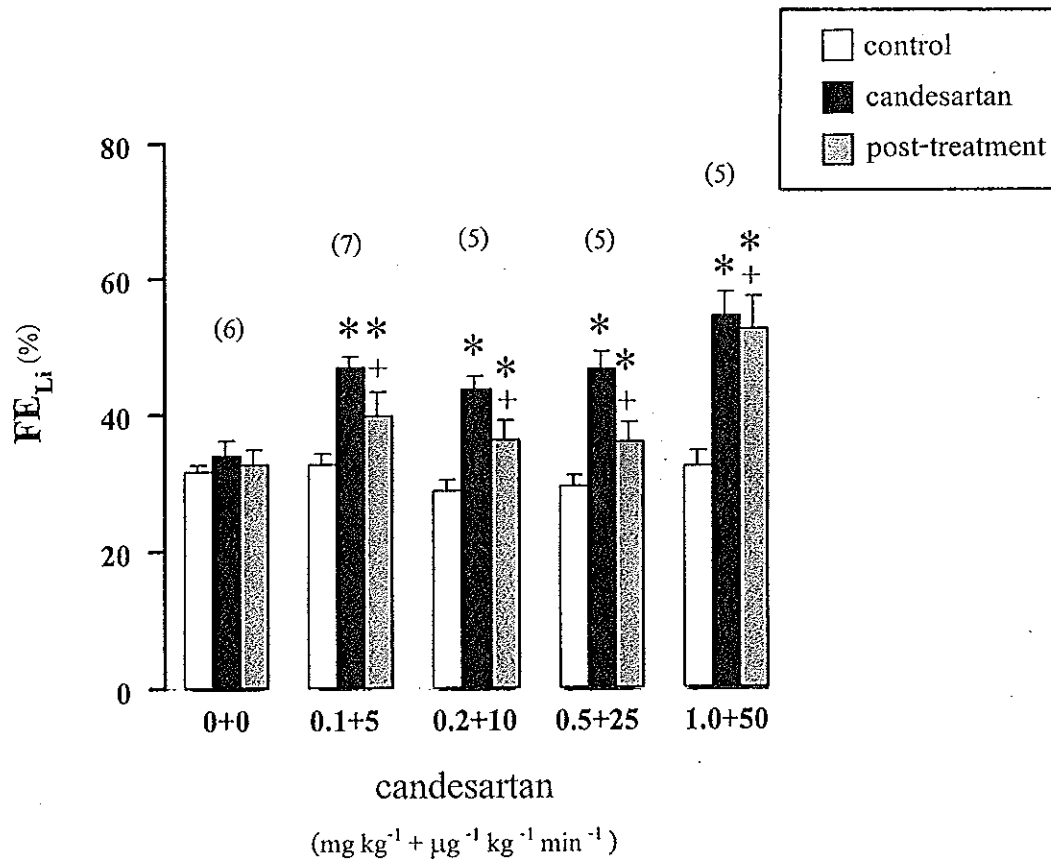


รูปที่ 3.10 ค่า lithium clearance (C_{Li}) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan

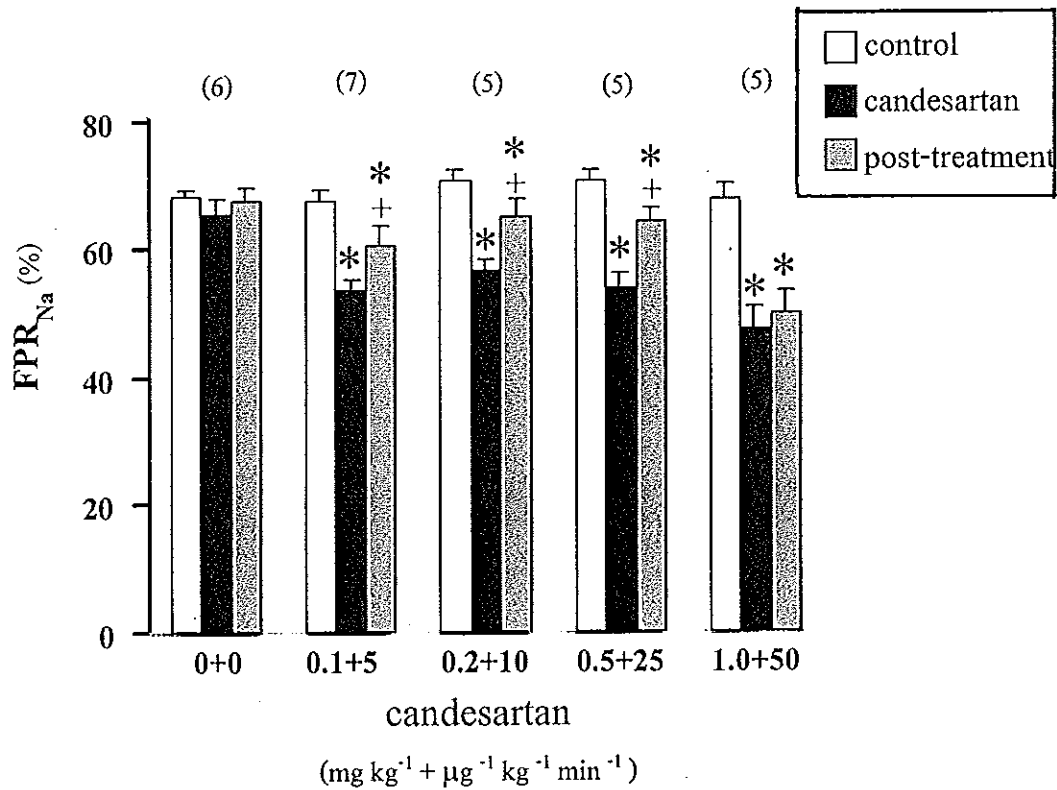
ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม

* แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)

+ แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา candesartan ($P < 0.05$)



รูปที่ 3.11 ค่า fractional lithium excretion (FE_{Li}) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม
 * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)
 + แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา candesartan ($P < 0.05$)



รูปที่ 3.12 ค่า fractional proximal reabsorption of sodium (FPR_{Na}) ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่ม

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ($P < 0.05$)

+ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา candesartan ($P < 0.05$)

4. บทวิจารณ์

ฮอว์โมน angiotensin II เป็นฮอว์โมนที่มีความสำคัญต่อการควบคุม renal hemodynamics และการดูดกลับ sodium และน้ำที่ไหลอดไตฝอยส่วน proximal จากการทดลองในหนูที่ได้รับยาสลบ โดยใช้ candesartan ในขนาดที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง MABP มีผลให้ RPF, GFR, sodium excretion และ fractional sodium excretion มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Cervenka et al., 1998) จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าการศึกษาที่ค่า fractional sodium excretion เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าภาวะ natriuresis อาจเกิดจากการยับยั้งการทำงานของ AII ในการดูดกลับ sodium และน้ำผ่าน AT_1 ที่ไหลอดไตฝอย แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวไม่สามารถระบุตำแหน่งของไหลอดไตฝอยในการทำให้เกิดภาวะ natriuresis ได้ การศึกษาผลของ candesartan ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่ไหลอดไตฝอยส่วน proximal โดยใช้วิธี lithium clearance ในครั้งนี้สามารถยืนยันได้ว่าในหนูที่สลบ candesartan ในขนาดที่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ผ่านทางตัวรับชนิด AT_1 ให้ผลยับยั้งการดูดกลับ sodium และน้ำที่ไหลอดไตฝอยส่วน proximal โดย candesartan ที่ขนาด $0.1 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ให้ผลไม่เปลี่ยนแปลง MABP, RPF และ GFR แต่ค่า C_{Li} และ FPR_{Na} เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.10, 3.12 และ ตารางที่ 3 ภาคผนวกที่ 4) ในขณะที่ candesartan ที่ขนาดสูงมีผลลด MABP, RPF และ GFR ค่า FF ไม่เปลี่ยนแปลง และค่า C_{Li} และ FPR_{Na} เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.12 และ ตารางที่ 3 ภาคผนวกที่ 4) แสดงให้เห็นว่า candesartan สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ทำให้ลดการดูดกลับ sodium ที่ไหลอดไตฝอยส่วน proximal ดังนั้น การศึกษาโดยใช้วิธี lithium clearance ในครั้งนี้สามารถยืนยันได้ว่า candesartan มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ในการดูดกลับ sodium และน้ำที่ไหลอดไตฝอยส่วน proximal ผ่านทางตัวรับชนิด AT_1

วิธี lithium clearance ที่เลือกใช้ในการทดลองครั้งนี้ สามารถยืนยันการดูดกลับ sodium และน้ำที่ไหลอดไตฝอยส่วน proximal ได้เป็นอย่างดี เนื่องจาก ในการทดลองครั้งนี้หนูทดลองได้รับอาหารที่มี sodium $34.4 \text{ mmol kg}^{-1}$ ร่วมกับได้รับ 0.9% NaCl ทางไหลอดเลือดค่าตลอดการทดลอง จึงเป็นไปได้ที่จะเกิดการดูดกลับ lithium และน้ำที่ไหลอดไตฝอยส่วน distal ซึ่งจะทำให้ค่าการดูดกลับ sodium เปลี่ยนไป นอกจากนี้การควบคุมระดับ lithium ในพลาสมาที่เหมาะสมเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการศึกษาด้วยวิธีนี้ โดยจะควบคุมให้มีระดับต่ำที่สุดเพื่อป้องกันพิษที่จะเกิดขึ้น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่าถ้าระดับ lithium ในร่างกายสูงเกินไปจะยับยั้งการดูดกลับ sodium และมีผลต่อการทำงานของไหลอดไตฝอย (Thomsen, 1976) ในการทดลองครั้งนี้ได้ควบคุม

คุมระดับ lithium ให้อยู่ในระดับต่ำด้วยการใช้วิธีผสม lithium ในอาหารเป็นระยะเวลา 2 วันก่อน การทดลองเพื่อเพิ่มระดับ lithium ในร่างกายให้สูงระดับหนึ่งก่อน เป็นการป้องกันไม่ให้อัตรา lithium ขนาดสูงในระหว่างการทดลอง จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าระดับ lithium ใน plasma มีค่าอยู่ในช่วง $0.2-0.3 \text{ mmol l}^{-1}$ (ตารางที่ 4 ภาคผนวกที่ 4) ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมและไม่ทำให้เกิดพิษตลอดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าวิธี lithium clearance สามารถใช้ศึกษาการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การออกฤทธิ์ของ candesartan ในการยับยั้งการทำงานของ AII ต่อการดูดกลับ sodium และ น้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ผ่าน AT_1 นั้นอาจเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์ทั้งด้าน luminal หรือ basolateral หรือทั้งสองด้านก็ได้ จากการศึกษาโดยใช้วิธี *in vivo* split-droplet micropuncture ของ Smart และคณะ (1999) โดยใช้ AT_1 receptor antagonist 3 ชนิดคือ losartan, EXP3174 และ candesartan ฉีดเข้าไปใน lumen ของหลอดไตฝอยส่วน proximal พบว่า candesartan สามารถยับยั้งการดูดกลับ sodium และน้ำได้ 20% จากผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่า candesartan มีผลยับยั้งการทำงานของ AII ต่อการดูดกลับ sodium ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal อย่างไรก็ตามในการทดลองโดยใช้วิธี lithium clearance ในครั้งนี้ พบว่า candesartan มีผลลดการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ได้ประมาณ 14% ซึ่งผลที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากวิธีที่เลือกใช้ในการทดลอง เนื่องจากวิธี *in vivo* split-droplet micropuncture สามารถศึกษาได้เฉพาะหน่วยไตชนิด superficial แต่วิธี lithium clearance สามารถศึกษาการทำงานของหน่วยไตทั้งหมดได้ ซึ่งผลนี้สามารถยืนยันความแตกต่างโดย Zhuo และคณะ (1993) ที่ใช้วิธี *in vivo* split-droplet micropuncture และวิธี lithium clearance ศึกษาผลของ DuP 753 ที่ให้ทางหลอดเลือดดำตลอดการทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งการดูดกลับ sodium และน้ำได้ 21% อย่างไรก็ตามเมื่อใช้วิธี lithium clearance พบว่าสามารถลดการดูดกลับ sodium และน้ำได้เพียง 9% และเนื่องจากมีรายงานสนับสนุนว่าสามารถพบ AT_1 ได้ที่ผนังเซลล์ทั้ง 2 ด้าน (Brown and Douglas, 1982; Thekkumkara, et al., 1998) ดังนั้นจึงไม่สามารถยืนยันได้ว่าจะไม่เกิดการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ผ่านทาง AT_1 ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral ของหลอดไตฝอยส่วน proximal

การออกฤทธิ์ของ AII ต่อการดูดกลับ sodium ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal และด้าน basolateral ของหลอดไตฝอยส่วน proximal มีกลไกผ่านทางการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยน sodium กับ H^+ (NHE) ที่ผนังเยื่อด้าน luminal (รูปที่ 1.3) โดยไม่ว่าการออกฤทธิ์ของ AII จะผ่านทาง AT_1 ที่ผนังเซลล์ด้านใดก็ตามแต่จะผ่าน final common pathway ตัวเดียวกันคือ NHE3 ที่อยู่ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal (Harris, et al., 1996) มีรายงานการศึกษาโดยวิธีแยกหลอดไตฝอยส่วน proximal ออกมาศึกษา พบว่าเมื่อให้ AII ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral จะสามารถเพิ่มการดูดกลับ

sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ได้ประมาณ 23-56% โดยผลที่ได้นี้จะมีย่านมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทำให้ AII ที่ขนาดเดียวกันทางผนังเซลล์ด้าน luminal (Schelling and Linas, 1994) แต่จากผลการทดลองโดยใช้วิธี lithium clearance ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของ endogenous AII ในหนูปกติที่สลับสามารถกระตุ้นการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ทั้งหมดได้ประมาณ 14% (ตารางที่ 3 ภาคผนวกที่ 4) แสดงว่า candesartan ออกฤทธิ์จับกับ AT_1 ที่ผนังเซลล์ทั้งสองด้าน แต่ไม่สามารถลดการดูดกลับ sodium ได้มากกว่า 50% อาจเนื่องมาจากขนส่ง sodium โดยอาศัย NHE เป็นกระบวนการขนส่งที่มีขีดจำกัด

การทดลองครั้งนี้นอกจากจะพบภาวะ natriuresis ในหนูที่ได้รับ candesartan ในขนาดที่ไม่เปลี่ยนแปลง MABP และ renal hemodynamic ($0.1 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) แล้วยังพบว่า potassium excretion และ fractional potassium excretion เพิ่มขึ้นในขณะเดียวกันด้วย ซึ่งในภาวะปกติร่างกายจะรักษาระดับ potassium ในเซลล์และใน plasma ให้คงที่เนื่องจากเป็นเกลือแร่ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ โดยหลอดไตฝอยมีความสำคัญต่อการควบคุมระดับ potassium ในร่างกาย โดยมีการดูดกลับ potassium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ประมาณ 99% จากที่กรองผ่าน glomerulus แต่ potassium จะถูกขับทิ้งประมาณ 92.6 % ซึ่งปริมาณที่เพิ่มขึ้นหลังจากถูกดูดกลับที่หลอดไตฝอยแล้วมาจากการคัดหลั่งที่หลอดไตฝอยส่วน distal และ collecting ปัจจัยที่ควบคุมการขับทิ้ง potassium ที่หลอดไตฝอยขึ้นอยู่กับ 1. การดูดกลับ potassium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal, 2. ฮอว์โมน aldosterone โดยการกระตุ้นเอนไซม์ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral ทำให้ปริมาณ sodium ในเซลล์ลด และปริมาณ potassium ในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งเสริมการคัดหลั่ง potassium สู่ออกของหลอดไตฝอย, 3. ความแตกต่างของความเข้มข้นของ potassium ภายในเซลล์กับของเหลวของหลอดไตฝอย และ 4. อัตราการไหลของของเหลวในหลอดไตฝอย การเพิ่มขึ้นของ potassium excretion ในครั้งนี้ น่าจะเป็นผลจากกลไกอย่างใดอย่างหนึ่งหรือการผสมผสานกันของ 2 กลไกขึ้นไป อย่างไรก็ตามกลไกที่น่าจะเป็นไปได้มากที่สุดคือการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ผ่านทางตัวรับชนิด AT_1 ทำให้มีผลยับยั้ง $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPase}$ ที่ผนังเซลล์ด้าน basolateral (Garvin, 1991; Aperia, et al., 1994) ทำให้การดูดกลับ sodium ลดลง ผลที่ตามมาจะทำให้ การดูดกลับ potassium ลดลงด้วย นอกจากนี้มีรายงานว่า การยับยั้งการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal จะลดการขนส่ง potassium ทางช่องทางการขนส่งผ่านระหว่างเซลล์ (Bomsztyk and Wright, 1982) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าเมื่อ candesartan มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ทำให้ลดการดูดกลับ sodium และน้ำ การขนส่ง potassium สู่ออกของเซลล์ผ่านทางต่างๆ ดังกล่าวจะลดลงไปด้วย

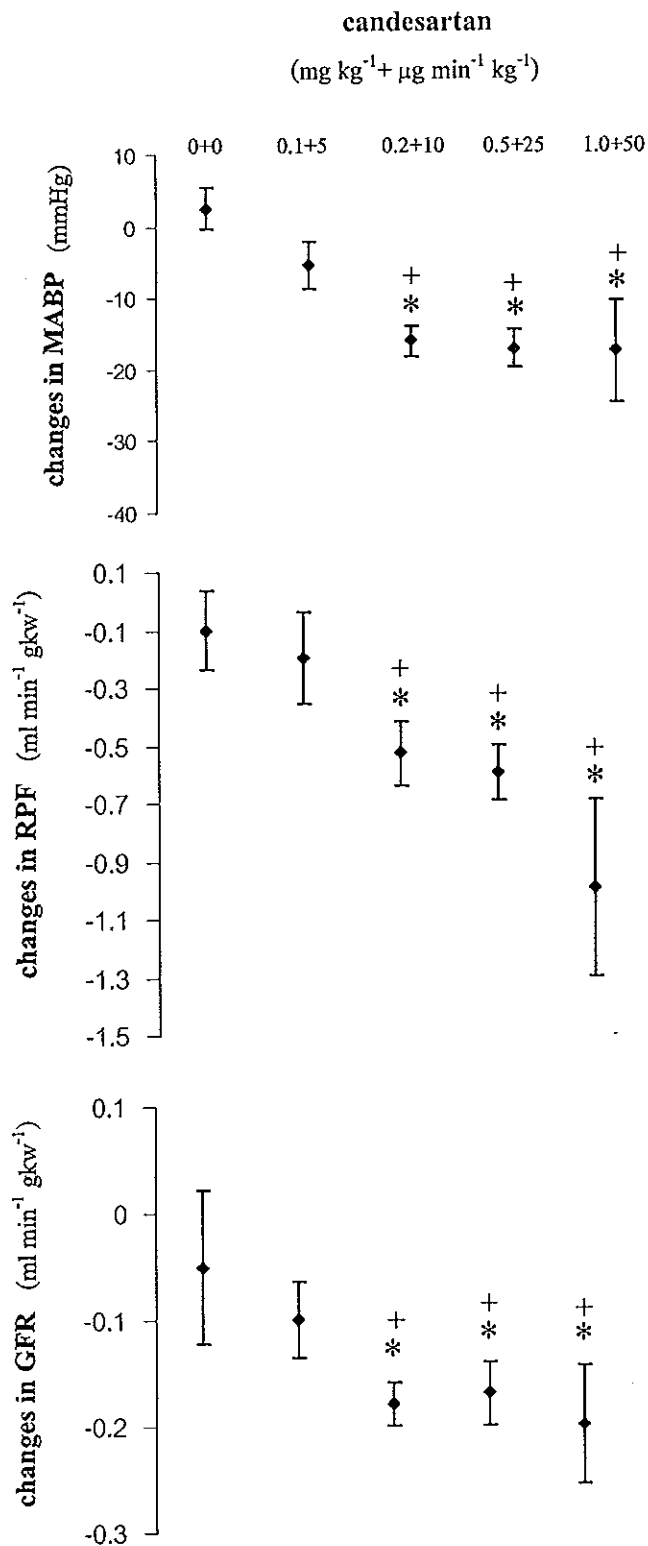
สำหรับ candesartan ที่ขนาดสูงขึ้นเป็น $0.2 \text{ mg kg}^{-1} + 10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $0.5 \text{ mg kg}^{-1} + 25 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ และ $1 \text{ mg kg}^{-1} + 50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ทำให้ MABP ลดลง แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์จะทำให้ total peripheral resistance ลดลง โดยที่ร่างกายไม่สามารถปรับชดเชยโดยการเพิ่ม CO หรือ sympathetic reflex ได้เพียงพอจึงเห็นผลว่า MABP ลดลง การทดลองครั้งนี้ขนาดของ candesartan ไม่ทำให้ MABP ลดลงแบบ dose dependent (16.1 ± 2.1 , 17.1 ± 2.6 และ $17.6 \pm 7.2 \text{ mmHg}$) และพบว่าการลดลงของความดันเลือดจะถึงจุดสูงสุดเมื่อให้ขนาด $0.2 \text{ mg kg}^{-1} + 10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ หรือมากกว่านี้ (รูปที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Xiao และ Widdop (1996) ในหนูปกติที่สลบโดยพบว่า candesartan ที่ขนาดใกล้เคียงกันลด MABP ได้มากที่สุดคือ 15 mmHg

candesartan ที่ขนาดสูงสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ทำให้ RPF และ GFR ลดลง โดยมีกลไกเกิดจากการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AII ต่อหลอดเลือดแดงทั่วร่างกาย ทำให้ total peripheral resistance ลดลงมีผลให้ renal arterial pressure ลดลง ซึ่งผลนี้จะเด่นชัดและเอาชนะการลดลงของ total renal vascular resistance ที่เกิดจากผลของ candesartan ในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ได้ จึงทำให้ RPF ลดลงในที่สุด สำหรับการลดลงของ GFR เป็นไปได้ว่ามาจากการลดลงอย่างเด่นชัดของ net filtration pressure ซึ่งเกิดจากการลดลงของค่า renal arterial pressure ซึ่งผลนี้จะเด่นชัดและเอาชนะการเพิ่มขึ้นของค่า K_r (เนื่องจากมีรายงานการศึกษาที่สนับสนุนว่า K_r มีค่าลดลงเมื่อได้รับ AII (Foidart, et al., 1980; Ichikawa and Brenner, 1984; Ardaillou, et al., 1987) ดังนั้นเมื่อได้รับ candesartan จึงน่าจะทำให้ K_r มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลให้ GFR มีค่าเพิ่มขึ้นในที่สุด) ดังนั้นจึงเห็นผล GFR ลดลงในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Cervenka และคณะ (1998) โดยพบว่า candesartan ที่ขนาดใกล้เคียงกันนี้สามารถยับยั้งการทำงานของ AII ทำให้ RBF และ GFR ลดลงเช่นกัน

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ candesartan ไปแล้ว 30 นาทีแล้วหยุดให้ยาสามารถเห็นผลของ candesartan ได้อีกอย่างน้อย 30 นาที โดยพบว่าขณะที่หนูได้รับ candesartan ขนาด $0.1 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ MABP, RPF และ GFR มีค่าลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อหยุดให้ยาพบว่า MABP, RPF และ GFR มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการออกฤทธิ์ของ candesartan จะต้องใช้เวลานานกว่า 30 นาที เชื่อว่าน่าจะเกิดจากการจับระหว่าง AII และ AT_1 ต้องใช้เวลาช่วงหนึ่ง ในขณะที่ candesartan ขนาดสูงพบว่าสามารถลด MABP, RPF และ GFR ในขณะที่ได้รับยาและหลังหยุดให้ยา (ช่วง post-treatment) แสดงว่าเมื่อให้ candesartan ขนาดสูงจะทำให้แย่งจับกับ AT_1 เกิดได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังแสดงว่าการสลายตัวหรือการทำลายฤทธิ์ของสารนี้ต้องใช้เวลามากกว่า 1 ชั่วโมง สอดคล้องกับรายงานของ Burnier และ

Brunner (1998) ที่ว่า candesartan มี half-life ประมาณ 9 ชั่วโมง โดยอยู่ในรูปที่จับกับโปรตีนในพลาสมาได้ถึง 98% ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วงระยะ post-treatment ยังเกิดจากการออกฤทธิ์ของ candesartan

เป็นที่น่าสังเกตว่าภาวะ natriuresis ยังสามารถเห็นผลได้ชัดเจนในช่วงเวลา post-treatment ของยาทุกขนาด แต่ภาวะ kaliuresis เห็นผลได้ไม่ชัดเจน แสดงว่ากลไกการจับทั้ง sodium และ potassium อาจจะมี ความแตกต่างกันหลังจากหยุดให้ยา



รูปที่ 1.4 แสดงค่า changes in mean arterial blood pressure, renal plasma flow และ glomerular filtration rate ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ candesartan ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control ของแต่ละกลุ่ม (p<0.05), + แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control (p<0.05)

5. บทสรุป

การทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าในหนูปกติที่สลบ

- 1) candesartan ในขนาดที่ยับยั้งการออกฤทธิ์ของ endogenous AII ที่ผ่านตัวรับชนิด AT₁ ต่อหลอดเลือดแดงทั่วร่างกายทำให้ systemic arterial blood pressure ลดลง หรือไม่เปลี่ยนแปลง ขึ้นกับขนาดของยา
- 2) candesartan สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AII ต่อการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal โดยตรงจากการศึกษาโดยวิธี lithium clearance โดยผลนี้ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลง systemic blood pressure และ renal hemodynamics
- 3) candesartan ในขนาดที่ลด systemic blood pressure, renal plasma flow และ glomerular filtration rate สามารถยับยั้งการดูดกลับ sodium และ potassium ที่หลอดไตฝอยได้

เอกสารอ้างอิง

- สมชาย เอี่ยมอ่อง, ธนันดา ตระการวณิช, วิษยชัย รักษ์เสวี. 2539. Renin-Angiotensin-Aldosterone System. ตำราโรคไต ครั้งที่ 1. โดย วิจิตร บุญพรธรรคาวิกมูล. สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร.
- Aguilera, G., Schirar, A., Baukal, A., and Catt, K. J. 1981. Circulating angiotensin II and adrenal receptor after nephrectomy. *Nature*. 289: 507-509.
- Amemiya, M., Loffing, J., Lotscher, M., Kaissling, B., Alpern, R. J. and Moe, O. W. 1995. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int*. 48: 1206-1215.
- Andreoli, T. E. and Schafer, J. A. 1979a. Effective luminal hypotonicity: the driving force for isotonic volume absorption. *Am. J. Physiol*. 236: F89-F96.
- Andreoli, T. E. and Schafer, J. A. 1979b. External solution driving force for isotonic fluid absorption in proximal tubule. *Federation Proceedings*. 38: 154-160.
- Aperia, A., Holtback, U., Syren, M-L., Svensson, L-B., Fryckstedt, J. and Greengard, P. 1994. Activation/deactivation of renal Na^+/K^+ -ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J*. 8: 436-439.
- Ardaillou, R., Sraer, J., Chansel, D., Ardaillou, N. and Sraer, J-D. 1987. The effects of angiotensin II on isolated glomeruli and cultured glomerular cells. *Kidney Int*. 31 (suppl 20): S74-S80.
- Arima, S., Ito, S., Omata, K., Tsunoda, K., Yaoita, H. and Abe, K. 1996. Activation of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) causes epoxyeicosatrienoic acids (EETs)-dependent vasodilation in the microperfused rabbit afferent arteriole (Af-Arts). *Hypertension*. 28: 515.
- Aronson, P. S., Nee, J. and Suhm M. A. 1982. Modifier role of internal H^+ in activating the Na^+/H^+ in renal microvillus membrane vesicles. *Nature*. 299: 161-163.

- Baer, L., Platman, S. R., Kassir, S. and Fieve, R. R. 1971. Mechanisms of renal lithium handling and their relationship to mineralocorticoids: a dissociation between sodium and lithium ions. *J. Psychiatr. Res.* 8: 91-105.
- Baillie, M. D., Rector, F. C. and Seldin, D. W. 1971. Angiotensin II in arterial and renal venous plasma and renal lymph in the dog. *J. Clin. Invest.* 5: 119-126.
- Barfuss, D.W. and Schafer, J.A. 1984a. Hyperosmolality of absorbate from isolated rabbit proximal tubule. *Am. J. physiol.* 247: F130-F139.
- Barfuss, D.W. and Schafer, J.A. 1984b. Rate of formation and composition of absorbate from proximal nephron segments. *Am. J. physiol.* 247: F117-F129.
- Barratt, L. J. F. C., Rector, Jr., Kokko, J. P. and Seldin, D. W. 1974. Factors governing the transepithelial potential difference across the proximal tubule of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* 53: 454-464.
- Barraclough, M. A., Jones, N. F. and Marsden, C. D. 1967. Effect of angiotensin on renal function in the rat. *Am. J. Physiol.* 212: 1153-1157.
- Bennet, J. P. and Snyder, S. H. 1976. Angiotensin II binding to mammalian brain membranes. *J. Biol. Chem.* 251: 7423-7430.
- Bergend, F. 1965. Renal clearance of inulin, polyfructosan-S and a polyethylene glycol (PE6 1000) in the rat. *Acta. Physiol. Scand.* 64: 238-244.
- Berk, B. C., Vekshtein, V., Gordon, H. M. and Tsuda, T. 1989. Angiotensin II stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 13: 305-314.
- Berry, C. A. 1983. Lack of effect of peritubular protein on passive NaCl transport in the rabbit proximal convoluted tubule. *J Clin Invest.* 71: 268-281.
- Biemesderfer, D., Pizzonia, J., Abu-Alfa, A., Exner, M., Reilly, R., Igarashi, P. and Aronson, P. S. 1993. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am. J. Physiol.* 265: F736-F742.

- Blair-West, J. R., Denton, D. A., McKinley, M. J. and Weisinger, R. S. 1997. Central infusion of the AT1 receptor antagonist losartan inhibits thirst but not sodium appetite in cattle. *Am. J. Physiol.* 272: R1940-R1945.
- Boer, W. H., Jones, J. A., Koomans, H. A. and Dorhout, Mees, E. J. 1987. Decreased lithium clearance due to distal tubular lithium reabsorption in sodium depleted dogs. *Renal. Physiol.* 10: 65-68.
- Boer, W. H., Braam, B., Fransen, R., Boer, P. and Koomans, H. A. 1997. Effects of reduction renal perfusion pressure and acute volume expansion on proximal tubule and whole kidney angiotensin II content in the rat. *Kidney Int.* 51: 44-49.
- Bohr, D.F. 1974. Angiotensin on vascular smooth muscle. In *Angiotensin*. Page and Bumpus (eds). Berlin SpringerVerlag. 424-440.
- Bomszyk, K. and Wright, F. S. 1982. Effects of transepithelial fluid flux on transepithelial voltage and transport of calcium, sodium, chloride and potassium by renal proximal tubule. *Kidney Int.* 21: 269.
- Bourdeau, J. E., Taylor, A. N. and Iacopino, A. M. 1993. Immunocytochemical localization of sodium-calcium exchanger in canine nephron. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4 (1): 105-110.
- Braam, B., Mitchell, K-D., Fox, J. and Navar, L. G. 1993. Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am. J. Physiol.* 264 (33): F891-F898.
- Brown, G. P. and Douglas, J. G. 1982. Angiotensin II binding sites on isolated rat renal brush border membranes. *Endocrinology.* 111: 1830-1837.
- Bunkenburg, B., Van Amelsvoort, T., Rogg, H. and Wood, J. 1992. Receptor mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 20: 746-757.
- Bruun, N. E., Skott, P., Lønborg-Jensen, H. and Giese, J. 1989. Unchanged lithium clearance during acute amiloride treatment in sodium-depleted man. *J. Clin. Invest.* 49: 259-263.
- Burg, M. B. and Green, N. 1976. Role of monovalent ions in the reabsorption of fluid by isolated perfused proximal renal tubule of the rabbit. *Kidney Int.* 10: 221-228.

- Burg, M. B. 1981. Renal handling of sodium, chloride, water, amino acids and glucose. In: *The Kidney*, edited by B.M. Brenner and Rector, F.C. Rector, Jr. Saunders Philadelphia. P328-370.
- Burnier M. and Brunner, H. R. 1998. Angiotensin II receptor antagonist in hypertension. *Kidney Int.* 68: S107-S111.
- Buter, H., Narvis, G., De Zeeuw, D. and De Jong, P. 1977. Renal hemodynamic effects of candesartan in normal and impaired renal function in humans. *Kidney Int.* 63: S185-S187.
- Caldwell, P. R. B., Seegal, B. C., Hsu, K. C., Das, M. and Soffer, R. L. 1976. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science.* 191: 1050-1051.
- Carone, F. A. and Peterson, D., R. 1980. Hydrolysis and transport of small peptides by the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 238: F151-F158.
- Cervenka, L., Wang, C. T. and Navar, L. G. 1998. Effects of acute AT₁ receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in rats. *Am. J. Physiol.* 274: F940-F945.
- Chan, Y. L. 1980. The role of norepinephrine in the regulation of fluid absorption in the rat proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther.* 215: 65-70.
- Chang, R. S. L. and Lotti, V. J. 1991. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Science.* 49: 1485-1490.
- Chantrelle, B. M., Cogan, M. G. and Rector, F. C., Jr. 1982. Direct evidence for coupled sodium-hydrogen exchange in the rat superficial proximal convoluted tubule. *Pflugers Arch.* 385: 186-189.
- Chen, M., Harris, M. and Rose, D. 1994. Renin mRNA in proximal tubule of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* 94 : 237-242.
- Cheng, H., Becker, B., Burns, K. and Harris, R. 1995. Angiotensin II upregulates type 1 angiotensin receptors in renal proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 95: 2012-2019.

- Chiaraviglio, E. 1976. Effect of renin-angiotensin system on sodium intake. *J. Physiol.* 255: 57-66.
- Chiu, A. T., Herblin, W. F., Ardecky, R. J., McCall, D. E., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wexler, R. R., Wong, P. C., Johnson, A. L. and Timmermans, P. B. M. W. M. 1989a. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 165: 196-203
- Chiu, A. T., McCall, D. E., Aldrich, P. E. and Timmermans, P. B. M. W. M. 1990a. [³H]DUP 753, a highly potent and specific radioligand for the Angiotensin II-1 receptor subtype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 1195-1202.
- Chiu, A. T., McCall, D. E., Price, W. A., Wong, P. C., Carini, D. J., Duncia, J. V., Wexler, R. R., Yoo, S. E., Johnson, A. L. and Timmermans, P. B. M. W. M. 1990c. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 711-718.
- Chiu, A.T., Dunscomb, J.H., McCall, D.E., Benfield, P., Baubonis, W., and Sauer, B. 1993. Characterization of angiotensin AT_{1a} receptor isoform by its ligand signature, *Regul Pept.* 44: 141-147.
- Christensen, S., Shalmi, M. and Petersen, J. S. 1988. Lithium clearance as an indicator of proximal tubular sodium handling during furosemide diuresis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 753-753.
- Cogan, M. G., Liu, F-Y., Wong, P. C. and Timmermans, P. B. M. W. M. 1991. Comparison of inhibitory potency by nonpeptide angiotensin II receptor antagonist PD123177 and DuP 753 on proximal nephron and renal transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 (2): 687-691.
- Coppola, S. and Fromter, E. 1994a. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO₃ cotransport and K conductance in renal proximal tubule: II. Effects of picomolar concentration. *Pfluger Arch.* 427: 143-150.
- de Gasparo, M., Whitebread, S., Mele, M., Motani, A. S., Whitcombe, P. J., Ramjouw, H. P. and Kamber, B. 1990. Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtype in the rat. *J. Car. Pha.* 16: S31-S35.

- Deschepper, C. F., Mellon, S. H., Cumin, F., Baxter, J. D. and Ganong, W. F. 1986. Analysis by immunohistochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal and pituitary of rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83 : 7552-7556.
- Dominguez, J. H., Juhaszova, M. and Feister, H. A. 1992. The renal sodium-calcium exchanger. *J. Lab. Clin. Med.* 119 (6): 640-649.
- Douglas, J. G., Romero, M. and Hopfer, U. 1990. Signalling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium. *Kidney Int.* 38 (supp 30): S43-S47.
- Dudley, D. T., Panek, R. L., Major, T. C., Lu, G. H., Burns, R. F., Klinkefus, B. A., Hodges, J. C. and Weishaar, R. E. 1990. Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol Pharmacol.* 38: 370-377.
- Dzau, V. J., Ellison, K. E., Brody, T., Ingelfinger, J. and Pratt, R. E. 1987. A comparative study of the distribution of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology.* 120: 2334-2338.
- Edwards, R. M., Stack, E. J., Weidley, E. F., Aiyar, N., Keenan, R. M., Hill, D. T. and Weinstock, J. 1992c. Characterization of renal angiotensin II receptors using subtype selective antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260:933-938.
- Eiam-Ong, S., Hilden, S. A., Johns, C. A. and Madias, N. E. 1993. Stimulation of basolateral $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter by angiotensin II in rabbit renal cortex. *Am. J. Physiol.* 265: F195-203.
- Endo, Y., Arima, S., Yaoita, H., Omata, K., Tsunoda, K., Takeuchi, K., Abe, K., and Ito, S. 1997. Function of angiotensin II type 2 receptor in the postglomerular efferent arteriole. *Kidney Int.* 52: S-205-S207.
- Ernsberger, P., Zhou, J., Damon, T. H. and Douglas, J. C. 1992. Angiotensin II receptor subtypes in cultured rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 263: F411-F416.
- Fitzsimons, J. T. 1972. Thirst. *Physio Reviews.* 52: 468-563.

- Foidart, J., Sraer, J., Delarue, F., Mahieu, P. and Ardaillou, R. 1980. Evidence for mesangial glomerular receptors for angiotensin II linked to mesangial cell contractility. *FEBS Lett.* 121 : 333-339.
- Fransen, R., Boer, W. H., De Roos-R., Boer, P. and Koomans, H. A. 1995. Effects of low-dose angiotensin II infusion on loop segment reabsorption: a free-flow micropuncture study in rat. *Clin. Sci. Colch.* 88 (3): 351-358.
- Friedman, P. A., Figueiredo, J. F., Maack, M. and Windhager, E. E. 1981. Sodium calcium interactions in the renal proximal convoluted tubule of the rabbit. *Am. J. Physiol.* 240: F558-F568.
- Fromter, E. and Gessner, K. 1974. Free-flow potential profile along rat kidney proximal tubule. *Pfugers Archives.* 351: 69-71.
- Fromter, E. 1977. Magnitude and significance of the paracellular shunt path in rat kidney proximal tubule. In: *Intestinal permeation*, edited by M. Karmner and F. Lauterbach. Amsterdam: *Experpta Medica.* 393-405.
- Fuhr, J., Kaczmarczyk, J. and Kruttgen, C. D. 1955. Eine einfache colorimetrische Method zur Inulin bestimmung fur Nieren-Clearance-Untersuchingen Bei stoffwechselgesunden and Diabetikern. *Klinische wochenschrift.* 33: 729-730.
- Garvin, J. L. 1991. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na^+/K^+ ATPase in rat proximal straight tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 1146-1152.
- Gasc, J. M., Shanmugan, S., Sibony, M. and Corvol, P. 1994. Tissue-specific expression of type I angiotensin II receptor subtypes. *Hypertension.* 24: 531-537.
- Geibel, J., Giebisch, G. and Boron, W. F. 1990. Angiotensin II stimulation both Na^+-H^+ and $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 87: 7917-7920.
- Gesek, F. A. and Schoolwerth, A. C. 1990. Hormonal interactions with the proximal Na^+/H^+ exchanger. *Am. J. Physiol.* 258 (27): F514-F521.

- Giebisch, G., Klose, R. M., Malnic, G., Sullivan, W. J. and Windhager, E. E. 1964. Sodium movement across single perfused tubules of rat kidney. *J Gen Physiol.* 47: 1175-1194.
- Gmaj, P., Murer, H. and Kinne R. 1979. Calcium ion transport across plasma membrane isolated from rat kidney cortex. *Biochem J.* 178: 549-557.
- Gomez, R. A., Lynch, K. R. and Chevalier, R. L. 1988. Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney. *Am. J. Physiol.* 254: F582-F587.
- Gomez, R. A., Lynch, K. R., Sturgill, B. C., Chevalier, R. L., Carey, R. M. and Peach, M. J. 1989. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am. J. Physiol.* 257: F850-F858.
- Gottschalk, C. W. and Mylle, M. 1959. Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis. *Am. J. Physiol.* 196: 927-936.
- Grady, E. F., Sechi, L. A., Griffin, C. A., Schambelan, M. and Kalinyak, J. E. 1991. Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.* 88: 921-933.
- Green, R. and Geibisch, G. 1984. Luminal hypotonicity, a driving force for fluid absorption from the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 246: F167-F168.
- Greger, R. 1990. Possible sites of lithium transport in the nephron. *Kidney Int.* S26-S30.
- Gross, F. 1968. The regulation of aldosterone secretion by the renin angiotensin system under various condition . *Acta Endocrinol.* 124: 41-64.
- Guder, W. G. 1979. Stimulation of renal gluconeogenesis by angiotensin II. *Biochem. Biophys. Acta.* 584: 507-520.
- Gullans, S. R., Avison, M. J., Ogino, T., Giebisch, G. and Shulman, R. G. 1985. NMR measurements of intracellular sodium in the rabbit proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 249: F160-F168.
- Gyory A. Z. and Kinne, R. 1971. Energy source for transepithelial sodium transport in rat proximal tubules. *Pflugers Arch.* 327: 234-260.

- Hall, J. E. 1986a. Regulation of glomerular filtration rate and sodium excretion by angiotensin II. *Fed. Proc.* 45: 1431-1437.
- Harris, P. J. and Young, J. A. 1977. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflugers Arch.* 367: 295-297.
- Harris, P. J. 1979. Stimulation of proximal tubular sodium reabsorption by Ile⁵ angiotensin II in the rat kidney. *Pflugers Archives.* 381: 83-85.
- Harris, P. J. 1992. Regulation of proximal tubule function by angiotensin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19: 213-222.
- Harris, P. J., Hiranyachattada, S., Antoine, A. M., Walker, L., Reilly, A. M. and Eitle, E. 1996. Regulation of renal tubular sodium transport by angiotensin II and atrial natriuretic factor. *Clin and Exp Pharmacol and Physiol. Supp.* 3: S112-S118.
- Harrison-Bernard. 1997. Immunohistochemical localization of ANG II AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am. J. Physiol.* 273: F170-F177.
- He, H., Tamaki, T., Tomohiro, A., Kita, T., Aki, Y., Kimura, S. and Abe, Y. 1994. Effects of CV-11974 on renal hemodynamic and renal function in dog. *Blood Pressure.* 5: 79-83.
- Healy, D. P., Ye, M. Q. and Troyanovskaya, M. 1995. Localization of angiotensin II type 1 receptor subtype mRNA in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 268: F220-F226.
- Hildebrandt, F., Pizzonia, J. H., Reilly, H. F., Reboucas, N. A., Sardet, C., Pouyssegur, J., Slayman, C. W., Arosón, P. S. and Igarashi, P. 1991. Cloning, sequence, and tissue distribution of a rabbit renal Na⁺/H⁺ exchanger transcript. *Biochim. Biophys. Act.* 1129: 105-108.
- Howlin, K. J., Alpern, R. J. and Rector, F. C. Jr. 1985. Amiloride inhibitor of proximal tubular acidification. *Am. J. Physiol.* 248: F773-F778.
- Ichikawa, I. and Brenner, B. M. 1984. Glomerular action of angiotensin II. *Am. J. Med.* 76:43-49.
- Inglefinger, J. R., Pratt, R. E., Ellison, K. E. and Dzau, V. J. 1986. Angiotensinogen mRNA is expressed in both rat renal cortex and medulla. *Hypertension.* 4: S434-S436.

- Inglefinger, J. R., Zuo, W. M., Fon, E. A., Ellison, K. E. and Dzau, V. J. 1990. In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 85: 417-423.
- Iwai, N., Inagami, T., Ohmichi, N., Nakamura, Y., Sacki, Y., Kinoshita, M. 1992. Differential regulation of rat AT_{1a} and AT_{1b} receptor mRNA. *Biochem. Biophysic. Research. Comm.* 15: 298-303.
- Jacobson, H. R. 1981. Transport characteristics of in vitro perfused proximal convoluted tubule. *Kidney Int.* 22: 425-433.
- Janice, G., Douglas, and Ulrich, H. 1994. Novel aspect of angiotensin receptors and signal transduction in the kidney. *Annual. Reviews. Inc.* 56: 649-669.
- Johnson M. D. and Malvin R. L. 1977. Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 232: F298-F306.
- Kahn, A. M., Dolson, G. M., Hise, M. K., Bennett, S. C. and Wienman, E. J. 1985. Parathyroid hormone and dibutyryl cAMP inhibit Na⁺/H⁺ exchanger in renal brush border vesicle. *Am. J. Physiol.* 247: F212-F218.
- Kakar, S. S., Riel, K. K. and Neill, J. D. 1992a. Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem. Biophysic. Research. Comm.* 15: 688-692.
- Kakar, S. S., Sellers, J. C., Devor, D. C., Musgrove, L. C. and Neil, J. D. 1992b. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem. Biophysic. Research. Comm.* 31: 1090-1096.
- Karnik, S. S., Husain, A. and Graham, R. M. 1996. Molecular determinants of peptide and non-peptide binding to the AT₁ receptor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 3: S58-S66.
- Kato, H., Suzuki, H., Tajima, S., Ogata, Y., Tominaga, T., Sato, A. and Saruta, T. 1991. Angiotensin II stimulated collagen synthesis in culture smooth muscle cells. *Hypertension.* 9: 17-22.
- Kill, F., Aukland, K. and Refsum, H. E. 1961. Renal sodium transport and oxygen consumption. *Am. J. Physiol.* 24: 511.

- Kimura, K., Sachiko, I., Takeshi, S., Naoe, S., Hikaru, Y., Isao, S., Naobumi, M., Shigeyoshi, O., Kazuhisa, M., Akihiro, T., Yasunobu, H., Atsuo, G., Tatsuo, S., Kazuo, M. and Masao, O. 1997. Location and action of angiotensin II type 1 receptor in the renal microcirculation. *Kidney Int.* 52: S-201-S-204.
- Kinne, R., Schimitz, J. E. and Kinne-Saffron, E. 1971. The localization of the Na^+/K^+ ATPase in the cells of rat kidney cortex. *Pflugers Archives.* 329: 191-206.
- Kobo, K., Kohara, Y., Yoshimura, Y., Inada, Y., Shibouta, Y., Furukawa, T., Kato, K., Nishikawa, T., and Naka, T. 1993. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonist synthesis and biological activity of potential products of benzimidazole-7-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* 36: 2343.
- Koh, E., Morimoto, S., Tomita, J., Rakugi, H., Jiang, B., Inoue, T., Nabata, T., Fukuo, K. and Ogihara, T. 1994. Effects of an angiotensin II receptor antagonist, CV-11974, on angiotensin II induced in cytosolic free calcium concentration, hyperplasia, and hypertrophy of culture vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23: 175-179.
- Kokko, J. E., Burg, M. B. and Orloff, J. 1971. Characteristics of NaCl and water transport in the renal proximal tubule. *J. Clin. Invest.* 50: 69-75.
- Koomans, H. A., Boer, W. H. and Dorhout-Mees, E. J. 1989: Evaluation of lithium clearance as a marker of proximal tubule sodium handling. *Kidney Int.* 36: 2-12.
- Kriz, W. 1987. A periarterial pathway for intrarenal distribution of renin. *Kidney Int.* 31. supp. 20: S51-S56.
- Kriz, W. and Bankir, L. 1988. A standard nomenclature for structures of the kidney. *Am. J. Physiol.* 254: F1-F8.
- Lafayette, R. A., Mayer, G., Park, S. K. and Meyer, T. W. 1992. Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J. Clin. Invest.* 90: 766-771.
- Leyssac, P. P. 1990. Validity of the lithium clearance concept assessed and tubular reabsorption of endogenous renin in the rat. *Renal. Physiol.* 1: 181-188.

- Leysac, P. P., Karlsen, F. M. and Holstein-Rathlou, N. H. 1997. Effect of angiotensin II receptor blockade on proximal tubule fluid reabsorption. *Am. J. Physiol.* 273: R510-R517.
- Lingard, J., Rumrich, G. and Young, J. A. 1973. Reabsorption of L-glutamine and L-histidine from various regions of the rat proximal convolution studied by stationary micropuncture: evidence that the proximal tubule is not homogeneous. *Pflügers Archives.* 342: 1-12.
- Liu, F-Y. and Cogan, M. G. 1987a. Kinetics of bicarbonate transport in the early proximal convoluted tubule. *Am. J. Physiol.* 253: F912-F916.
- Liu, F-Y. and Cogan, M. G. 1987b. Angiotensin II: a potent regulator of acidification in the rat early proximal convoluted tubule. *J. Clin. Invest.* 80: 272-275.
- Liu, F-Y. and Cogan, M. G. 1988. Angiotensin II stimulation of hydrogen ion secretion in the early proximal tubule: Mode of action, mechanism, and kinetics. *J. Clin. Invest.* 82: 601-607.
- Liu, F-Y. and Cogan, M. G. 1989. Angiotensin II stimulation early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. *J. Clin. Invest.* 84: 83-91.
- Liu, F-Y. and Cogan, M. G. 1990. Role of angiotensin II in glomerulotubular balance. *Am. J. Physiol.* 259: F72-F79.
- Lowitz, H. D., Stumpe, K. O. and Ochwaldt, B. 1969. Micropuncture study of the action of angiotensin II on tubular sodium and water reabsorption in the rat. *Nephron.* 6: 172-187.
- Malvin and Vander, 1967. Effects of angiotensin infusion on renal function in the unanesthetized rat. *Am. J. Physiol.* 213: 1205-1208.
- Mello-Aires, M., Barreto-Chaves, M. L., Nascimento, G. and Oliveira-Souza, M. 1997. Interaction of ANP and Angiotensin II in tubular nephron acidification. *Braz. J. Med. Biol. Research.* 30: 471-477.
- Mendelsohn, F. A. O. 1976. A method for measurement of angiotensin II in tissues and its application to rat kidney. *Clin. Sci. Molecular. Med.* 51: 111-125.

- Mitchell, K. D. and Navar, L. G. 1990. Tubuloglomerular feedback responses during peritubular infusions of calcium channel blockers. *Am. J. Physiol.* 258; F537-F544.
- Mitchell, K. D., Jacinto, S. M. and Mullins, J. J. 1997. Proximal tubular fluid, kidney, and plasma levels of angiotensin II in hypertensive ren-2 transgenic rats. *Am. J. Physiol.* 273: F246-F253.
- Moe, O. W., Alper, R. J. and Henrich, W. L. 1993. The renal proximal tubule renin-angiotensin system. *Semin. Nephrol.* 13: 552-557.
- Morduchowicz, G. A., Sheikh-Hamad, D., Dwyer, B. E., Stern, N., Jo, O. D. and Yanagawa, N. 1991. Angiotensin II directly increases rabbit renal brush border membrane sodium transport: presence of local signal transduction system. *J. Membr. Biol.* 122: 43-53.
- Morel, F. and Muruyama, Y. 1970. Simultaneous measurement of unidirectional and net sodium fluxes in microperfusion rat proximal tubule. *Pflugers Arch.* 320: 1-23.
- Morell, G., Steplock, D., Shenolikar, S. and Weinman, E. J. 1990b. Identification of a putative Na^+/H^+ exchanger regulatory cofactor in rabbit renal BBM. *Am. J. Physiol.* 259: F867-F871.
- Mullins, L. J. A. 1977. A mechanism for Na/Ca transport. *J. Gen. Physiol.* 70: 681-695.
- Narva, L. G. and Langford, H. G. 1974. Effects of angiotensin II on the renal circulation. In: *Angiotensin, Handbook of Experimental Pharmacology*, edited by I. H. Page and F. M. Bumpus, Berlin. Springer-Verlag. P455-474.
- Navar, L. G., Lewis, L., Hymel, A., Braam, B. and Mitchell, K. D. 1994. Tubular fluid concentration and kidney contents of angiotensin I and II in anesthetized rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5: 1153-1158.
- Norman, J., Baide-Dezfooly, B., Nord, E. P., Kurtz, I., Schlosser, J., Chaudhart, A. and Fine, L. G. 1987. EGF-induced mitogenesis in proximal tubular cells: potentiation induced mitogenesis by angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 253: F229-F309.
- Orlowski, J., Kandasamy, R. A. and Shull, G. E. 1992. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchange gene family. *J. Biol. Chem.* 267: 9331-9339.

- Owens, G. K. 1989. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am. J. physiol.* 257: H1755-H1765.
- Paillard, M. 1997. Na⁺/H⁺ exchanger subtypes in the renal tubule: function and regulation in physiology and disease. *Exp. Nephrol.* 5: 277-284.
- Pandey, K. N., Misono K. S. and Inagami, T. 1984. Evidence for intracellular formation of angiotensin: coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. *Biochem. Biophysic. Research. Commu.* 16: 1337-1343.
- Paxton, W. G., Runge, M., Horaist, C., Cohen, C., Alexander, R. W. and Bemstein, K. E. 1993. immunohistochemical localization of renal angiotensin II AT₁ receptor. *Am. J. Physiol.* 264: F989-F995.
- Peterson, D. R., Chrabaszcz, G., Peterson, W. R. and Oparil, S. 1979. Mechanism for renal tubular handling of angiotensin. *Am. J. Physiol.* 236: F365-F372.
- Preisig, P. A. and Rector, F. C., Jr. 1988. Role of Na⁺/H⁺ antiport in rat proximal tubular NaCl absorption. *Am. J. Physiol.* 255 (24): F461-F465.
- Pucell, A. G., Hodges, J. C., Sen, I., Bumpus, F. M. and Husain, A. 1991. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. *Endocrinology.* 128: 1947-1959.
- Rahman, A. R., Motwani, L. G., Lang, C. C., Struthers, A. D. 1993. Circulating angiotensin II and renal sodium handling in man: a dose-response study. *Clin. Sci Colch.* 85 (2): 147-156.
- Ray, S. G., Morton, J. J., Dargie, H. J. 1994. Relationship of renin, angiotensin II and atrial natriuretic factor to clinical status in the early post-infarct period in patients with ventricular dysfunction. *Eur. Heart. J.* 15: 793-800.
- Rector, F. C., Jr. 1983. Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 244 (13): F461-F471.
- Reilly, R. F., Hildebrant, F., Biemesderfer, D., Sardet, C., Pouyssegur, J., Aronson, P. S., Slayman, C. W., Igarashi, P. 1991. cDNA cloning and immunolocalization of a Na (+)-H (+) exchanger in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 261: F1088-F1094.

- Reilly, A. M., Harris, P. J. and Williams, D. A. 1995. Biphasic effects of angiotensin II on intracellular sodium concentration in rat proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 269: F374-F380.
- Robertson, A., Smeby, F., Bumpus, M. and Page, I. 1965. Renin production by organ culture of renal cortex. *Science.* 149: 650-657.
- Rosivall, L., Narkates, A. J., Oparil, S. and Navar, L. G. 1987. De novo intrarenal formation of angiotensin II during control and enhanced renin secretion. *Am. J. Physiol.* 252: F1118-F1123.
- Saccomani, G., Mitchell, K. D. and Navar, L. G. 1990. Angiotensin II stimulation of Na^+/H^+ exchange in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 258: F1188-F1195.
- Sachinidis, A., Ko, Y., Weisser, P., Meyer zu Brickwedde, M-K., Dusing, R., Christian, R., Wieczorek, A. J. and Vetter, H. 1993. : EXP3174, a metabolite of losartan (MK954, DuP 753) is more potent than losartan in blocking the angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 11: 155-162.
- Sakai, R. R., Nicolaidis, S. and Epstein A. N. 1986. Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. *Am. J. Physiol.* 251: R762-R768.
- Sandberg, K., Ji, H., Clark, A. J. L., Shapira, H. and Catt, K. J. 1992. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 267: 9455-9458.
- Sardet, C., Franchi, A. and Pouyssegur, J. 1989. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell.* 56: 271-280.
- Schafer, J. A., Troutman, S. L. and Andreoli, T. E. 1974. Volume reabsorption, transepithelial potential differences, and ionic permeability properties in mammalian superficial proximal straight tubules. *J. Gen. Physiol.* 64: 582-607.
- Schafer, J. A., Patlak, C. S. and Andreoli, T. E. 1975. A component of fluid absorption linked to active and passive ion flows in the superficial pars recta. *J. Gen. Physiol.* 66: 445-471.
- Schafer, J. A., Patlak, C. S., Troutman, S. L. and Andreoli, T. E. 1978. Volume absorption in the pars recta L "Simple" active Na^+ transport. *Am. J. Physiol.* 3: F332-F339.

- Schafer, J. A. 1984. Mechanisms coupling the absorption of solutes and water in the proximal nephron. *Kidney Int.* 25: 708-716.
- Schafer, J. A., Troutman, S. L. and Schlatter, E. 1990. Vasopressin and mineralocorticoid increase apical membrane driving force K^+ secretion in rat CCD. *Am. J. Physiol.* 258: F119-F220.
- Schelling, J. R., Linas, S. L. 1994. Angiotensin II –dependent proximal tubule sodium transport requires receptor-mediated endocytosis. *Am. J. Physiol.* 266: C669-C675.
- Schmidt, U. and Dubach, U. C. 1971. Na-K stimulation adenosine triphosphatase: Intracellular localisation within the proximal tubule of the rat nephron. *Pflügers Archives.* 330: 265-269.
- Schunkert, H., Ingelfinger, J. R. and Dzau, V. J. 1991. Evolving concepts of the intrarenal renin-angiotensin system in health and disease: contribution of molecular biology. *Renal. Physiol. Biochem.* 14: 146-154.
- Schuster, V. L., Kokko, J. P. and Jacobson, H. R. 1984. Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J. Clin. Invest.* 73: 507-515.
- Sechi, L. A., Grady, E. F., Griffin, C. A., Kalinyak, J. E. and Schambelan, M. 1992. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am. J. Physiol.* 262: F236-F240.
- Seikaly, M. G., Arant, B. S. Jr. and Seney, F. D. Jr. 1990. Endogenous angiotensin concentration in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J. Clin. Invest.* 86: 1352-1357.
- Shalmi, M. and Thomsen, K. 1989. Alterations of lithium clearance in rats by different modes of lithium administration. *Renal Physiol.* 12: 273-280.
- Shibouta, Y., Inada, M., Ojima, T., Wada, M., Noda, T., Sanada, K., Kubo, Y., Kohara, T., Naka, T., and Nishikawa, K. 1993. Pharmacological profile of a high potent and long acting angiotensin II receptor antagonist, 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid (CV11974), and its prodrug, (±)-1-cyclohexylcarbonyloxyethyl 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate (TCV-116), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 114.

- Shirley, D. G., Walter, S. J. and Thomsen, K. 1983. A comparison of micropuncture and lithium clearance methods in the assessment of renal tubular function in rats with diabetes insipidus. *Pflugers*. 4: 266-270.
- Siragy, H. M., Inagami, T., Ichiki, T. and Carey, R. M. 1999. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 25: 6506-6510.
- Smart, M. L., Hiranyachattada, S. and Harris, P. J. 1999. Effects of angiotensin II receptor blockade on proximal fluid uptake in rat kidney. *British. J. Pharma.* 126: 697-700.
- Smart, M. L. 1999. "The Actions of Angiotensin II and Angiotensin 1-7 on Proximal Tubular Fluid Transport in the Rat Kidney." University of Melbourne.
- Smith, H. W., Finkelstein, N. and Aliminoso, L. 1945: The renal clearance of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *J. Clin. Invest.* 42: 388-404.
- Sonnenberg, H., Honrath, U., Chong, C. K., Wilson, D. R. 1986. Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 250:F963-F966.
- Song, K., Zhuo, J., Allen, A. M., Paxinos, G. and Mendelsohn, F. A. O. 1991. Angiotensin II receptor subtypes in rat brain and peripheral tissues. *Cardiology.* 79: 45-54.
- Spinelli, F. and Walther, A. 1979. Modulation by prostaglandins of angiotensin II-induced stimulation of sodium transport in the proximal tubule of the rat. In: Paris: INSERM. 273-278.
- Takada, Y., Hiward, K., Unno, M. and Kokubu, T. 1982. Immunocytochemical location of angiotensin converting enzyme at the ultrastructural level in the human lung and kidney. *Biochem. Res.* 3: 169-174.
- Taugner, R., Hackenthal, F., Nobiling, R. and Paulsen, K. 1987. Immunocytochemical of the renin angiotensin system: renin, angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin II, and converting enzyme in the kidney of mice, rat, and tree shrews. *Kidney Int.* 22: S33-S43.
- Taylor, A. and Windhager, E. E. 1979. Possible role of cytosolic calcium and Na-Ca exchange in regulation of transepithelial sodium transport. *Am. J. Physiol.* 236: F505-F512.

- Thekkumkara, T. J., Rochelle, C. and Stuart, L. L. 1998. Angiotensin (AT₁) receptor-mediated increase in intracellular sodium transport in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 274 : F897-F905.
- Thomsen, K. and Schou, M. 1968. Renal lithium clearance in man. *Am J Physiol.* 215: 823-827.
- Thomsen, K., Hostein-Rathlou, N. H., Leyssac, P. P. 1981. Comparison of three measures of proximal tubular reabsorption: Lithium clearance, occlusion time, and micropuncture. *Am. J. Physiol.* 241: F348-F355.
- Thomsen, K. and Olesen, O. V. 1984. Renal lithium clearance as a measure of the delivery of water and sodium from the proximal tubule in human. *Am. J. Med. Sci.* 288: 158-161.
- Thomsen, K., Leyssac P. P. 1986. Effect of dietary sodium content on renal handling of lithium. *Eur. J. Physiol.* 1986: 55-58.
- Timmermans, P. B. M. W. M., Benfield, P., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Wong, P. C. and Smith, R. D. 1992. Angiotensin II receptor and functional correlates. *Am. J. Hypertension.* 5: 2215-2355.
- Timmermans, P. B. M. W. M., Wong, P. C. and Chiu, A. T. 1993. Angiotensin II receptor and angiotensin II receptor antagonist. *Pharmacol Review.* 45: 205-251.
- Tse, C-M., Brant, S. R., Walker, S., Pouyssegur, J. and Donowitz, M. 1992. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J. Biol. Chem.* 267 (13): 9340-9346.
- Tse, C-M., Levine, S. A., Yun, C. H., Montrose, M. H., Little, P. J., Pouyssegur, J. and Donowitz, M. 1993a. Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamide-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). *J. Biol. Chem.* 268: 11917-11924.
- Tse, C-M., Levine, S., Yun, C., Brant, S., Pouyssegur, J. Montrose, M. H. and Donowitz, M. 1993b. The mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family-initial structure/function studies [editorial]. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4: 969-975.
- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlkf, P., Hohle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., and Zhu, Y.Z. 1996. Angiotensin receptors. *J. Hypertens.* 4:205-251.

- Vandewalle, A., Framan, N., Bencsath, P. and Bonvalet, P. 1981. Aldosterone binding along the rabbit nephron: An autoradiographic study on isolated tubule. *Am. J. Physiol.* 240: F172-F179.
- Wakabayashi, S., Bertranni, B., Ikeda, T., Pouyssegur, J. and Shigekawa, M. 1994. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchange (NHE-1) highly H⁺ sensitive to Ca⁺⁺ regulation. *J. Biolo. Chem.* 269: 13170-13716.
- Walker, A. M., Bott, P. A., Oliver, J. and MacDowell, M. C. 1941. The collection and analysis of fluid from a single nephron of mammalian kidney. *Am. J. Physiol.* 134: 580-595.
- Wang, T and Chan, Y. 1990. Mechanism of angiotensin II action on proximal tubular transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252 (2): 689-695.
- Wang, T. and Chan, Y. 1991. The role of phosphoinositide turnover in mediating the biphasic effect of angiotensin II on renal tubular transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 309-317.
- Wang, T. and Giebisch, G. 1996. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 271: F143-149.
- Wang, T., S. K., Agulian, G. G. and Aronson, P. S. 1993. Effects of formate and oxalate on chloride absorption in rat distal tubule. *Am. J. Physiol.* 264: F730-F736.
- Waugh, W. H. 1972. Angiotensin II: local renal effects of physiological increments in concentration. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 50: 711-718.
- Weisinger, R. S., Blair-West, J. R., Denton, D. A and Tarjan, E. 1997. Role of brain angiotensin II in thirst and sodium appetite of sheep. *Am. J. Physiol.* R187-196.
- Wiest, S. A., Rampersaud, A., Zimmerman, K., Steinberg, M. I. 1991. Characterization of distinct angiotensin II binding sites in rat adrenal gland and bovine cerebellum using selective nonpeptide antagonists. *J of Cardio. Pharm.* 17: 177-184.
- Wirthensohn, G., Lefrank, S. and Guder, W. G. 1984. Phospholipid metabolism in rat kidney cortical tubule : II. Effects of hormone ³³P incorporation. *Biochem. Biophys. Acta.* 795: 501-510.
- Wirthensohn, G. and Guder, W. G. 1985. Stimulation of Phospholipid turnover by angiotensin II in rat renal cortex. *Pflugers Arch.* 404: 94-96.

- Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B. and De Gasparo, M. 1989. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtype. *Biochem. Biophys. Research. Commu.* 163: 284-291.
- Wolf, G. and Neilson, E. G. 1990. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in culture murine proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 259: F678-F777.
- Wong, P. C., Price, W. A., Chiu, A. T., Carini, D. J., Duncia, J. V., Johnson, A. L., Wexler, R. R. and Timmermans, P. B. M. W. M. 1990a. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: studies with EXP 9270 and DuP 753. *Hypertension.* 15: 823-834.
- Wong, P. C., Hart, S. D., Zaspel, A., Chiu, A. T., Smith, R. D., and Timmermans, P. B. M. W. M. 1990c. Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (AII-1) and PD123177 (AII-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 584-592.
- Wong, P. C., Hart, S. D., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Carini, D. J., Smith, R. D., Wexler, R. R. and Timmermans, P. B. M. W. M. 1991a. Pharmacology of DuP 532, a selective and noncompetitive AT₁ receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 861-870.
- Wong, P. C. and Edward, J. 1998. The receptor subtype mediating the action of angiotensin II on intracellular sodium in rat proximal tubules. *British. J. Pharmacol.* 124: 41-46.
- Xio, C. L., and R. E. Widdop. 1995. Regional hemodynamic effects of the AT₁ receptor antagonist CV-11974 in the conscious renal hypertensive rat. *Hypertension.* 26: 989-997.
- Xio, C. L., and R. E. Widdop. 1996. Angiotensin type I receptor antagonist CV-11974 and EXP 3174 cause selective renal vasodilatation in conscious spontaneously hypertensive rats. *Clin. Science.* 91: 147-154.
- Yanagava, N., Capparelli, A. W., Jo, O.D., Friedal, A., Barrett, J. D. and Eggena, P. 1991. Production of angiotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture. *Kidney Int.* 39: 938-941.
- Yingst, D. R. and Hoffman, J. F. 1981. Effect of intracellular Ca²⁺ on inhibiting the Na⁺/K⁺ pump and stimulation Ca²⁺-induced transport in resealed human red cell ghosts. *Fed. Proc.* 40: 543.

- Yuan, B. H., Robinette, J. B. and Corner, J. D. 1990. Effect of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am. J. Physiol.* 258: F741-F750.
- Zhuo, J. 1990. The Regulation of Proximal Tubular Reabsorption in The Rat Kidney , University of Melbourne. (Unpublished)
- Zhuo, J., Emsberger, P. and Douglas, J. G. 1993. A novel angiotensin receptor subtype in rat mesangium. Coupling to adenylyl cyclase. *Hypertension.* 21 : 1035-1038.
- Zhuo, J., Alcorn, D., Harris, P. J., McCausland, J., Aldred, G. P. and Mendelson, F. A. O. 1995a. Angiotensin II receptor subtypes in the kidney: Distribution and function. *Nephrology* 1: 511-525.
- Zhuo, J., Alcorn , D., McCausland, J., Casley, D. and Mendelsohn, F. A. O. 1994a. In vivo occupancy of angiotensin II subtype I receptor in rat renal preglomerular vessels. *Hypertension.* 23: 838-843.
- Zhuo, J., Alcorn , D., McCausland, J. and Mendelsohn, F. A. O. 1994b. Localization and regulation of Angiotensin II receptors in rat renal medullary interstitial cells. *Kidney Int.* 46: 1485-1994.
- Zimmerman, E. A., Ma, L. Y., Nilaver, G. 1987. Anatomical basis of thirst and vasopressin secretion . *Kidney Int.* 32: S14-S19.

ภาคผนวกที่ 1

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ polyfructosan (PFS) (Fuhr, et al., 1955)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน polyfructosan ไว้ที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mmol l⁻¹ โดยเตรียมจาก 25 % inutest

2. เตรียม anthrone reagent

2.1 นำน้ำกลั่นปริมาตร 120 ml ใส่ในน้ำแข็ง

2.2 เมื่อน้ำอุณหภูมิเย็นจัดเท H₂SO₄ ปริมาตร 300 ml อย่างช้าๆ (น้ำจะต้องแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา)

2.3 ผสม anthrone น้ำหนัก 0.756 g ลงในสารละลาย หลังจากนั้นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บสารละลาย anthrone ในขวดแก้วสีชาแช่เย็น ด้วยวิธีนี้จะเก็บสารละลายไว้ได้ประมาณ 3 สัปดาห์

3. เจือจางตัวอย่าง urine ที่จะใช้วิเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 หลังจากสารละลายผสมกันดีแล้ว ดูดสารละลายปริมาตร 10 µl ใส่ในหลอดทดลอง และเช่นเดียวกันในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน PFS ของ urine ใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ในปริมาตร 10 µl ใส่ในหลอดทดลอง หลังจากนั้นใส่สารละลาย anthrone ที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน

4. สำหรับสารละลายมาตรฐาน PFS ของ plasma และตัวอย่างของ plasma จะใช้สารปริมาตร 25 µl ผสมกับ ZnSO₄ ปริมาตร 250 µl และ NaOH ปริมาตร 100 µl ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นโดยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 250 ml ใส่หลอดทดลอง หลังจากนั้นใส่สารละลาย anthrone ที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน

5. นำสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างทั้งหมดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที

6. อ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร

ภาคผนวกที่ 2

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ para-aminohippuric acid (PAH) (Smith, et al., 1945)

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน PAH เตรียมโดยใช้ผง PAH ละลายในน้ำกลั่นโดยให้ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.1 mg%
2. เตรียมสารเคมีที่จะใช้เป็นสาร reagent ได้แก่
 - 0.2 N HCl
 - 0.1 % sodium nitrite, NaNO_2
 - 0.5 % ammonium sulphamate, $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$
 - 0.1 % N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (N-1-NED)
 - 3.2 % Trichloroacetic acid (TCA)
3. นำตัวอย่าง plasma ปริมาตร 50 μl ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งแต่ละหลอดมี 3.2% TCA ปริมาตร 1100 μl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นดูดเอาเฉพาะของเหลวปริมาตร 1 ml มาทดลองต่อไป
4. นำ urine ปริมาตร 10 μl เจือจางครั้งแรกใน 3.2% TCA ปริมาตร 1100 μl ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 10 μl เจือจางครั้งที่สองใน 3.2% TCA ปริมาตร 1100 μl อีกครั้ง (ใช้กรณีใช้อัตราการขับ urine เท่ากับ $10 \mu\text{l} 100 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ แต่ถ้ากรณีอัตราการขับ urine สูงกว่านี้ การเจือจางครั้งที่สองจะใช้สารละลายปริมาตร 25 μl) จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วดูดเอาสารละลายปริมาตร 100 μl ใส่ในหลอดทดลอง
- 5 สำหรับสารละลายมาตรฐานของ plasma และ urine ใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้ปริมาตร 50 μl ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี 3.2 % TCA ปริมาตร 1100 μl อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน
6. นำสารละลายมาตรฐาน, สารตัวอย่าง urine และสารตัวอย่าง plasma ที่เตรียมไว้มาทดลองต่อไป โดยแต่ละหลอดจะใส่สารละลาย 0.2 N HCl ปริมาตร 200 μl และ 0.1% NaNO_2 ปริมาตร 100 μl ตามลำดับผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 3-5 นาที จากนั้นใส่สารละลาย 0.5% ammonium sulfamate ปริมาตร 100 μl ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที หลังจากนั้นใส่สารละลาย 0.1% N-(1-naphthyl) ปริมาตร 100 μl ผสมให้เข้ากันทิ้งสารละลายทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20-60 นาที
7. อ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

ภาคผนวกที่ 3

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ lithium

1. เตรียม lithium diluent ประกอบด้วย KCl 4.7 mmol l^{-1} , Triton-X 0.1 g l^{-1} ผสมในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้เข้ากัน
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน lithium โดยใช้ lithium chloride ละลายใน lithium diluent ให้ได้ความเข้มข้น $1.018, 0.036, 0.072, 0.108$ และ $0.144 \text{ mmol l}^{-1}$
3. นำตัวอย่าง plasma ปริมาตร $100 \mu\text{l}$ ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml
4. นำตัวอย่าง urine ปริมาตร $100 \mu\text{l}$ ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml
5. วิเคราะห์หาปริมาณ lithium ด้วยเครื่อง inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer (ICP-AES) ที่ช่วงคลื่น 670.8 นาโนเมตร

ภาคผนวกที่ 4

ตารางที่ 1 แสดงค่า mean arterial blood pressure (MABP), renal plasma flow (RPF), glomerular filtration (GFR) และ filtration fraction (FF) ของหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan

candesartan (mg kg ⁻¹ + µg kg ⁻¹ min ⁻¹)	experimental period	MABP (mmHg)	RPF (ml min ⁻¹ gkw ⁻¹)	GFR (ml min ⁻¹ gkw ⁻¹)	FF (%)
0.1 + 0.5 (n=7)	control	127.5 ± 2.0	3.68 ± 0.14	1.33 ± 0.06	37.41 ± 2.2
	candesartan	122.1 ± 3.4	3.50 ± 0.18	1.24 ± 0.07	36.60 ± 2.4
	post-treatment	110.0 ± 6.5*+	2.90 ± 0.16*	1.15 ± 0.6*	41.30 ± 3.8
0.2 + 10 (n=5)	control	130.4 ± 4.6	4.12 ± 0.18	1.48 ± 0.09	37.93 ± 3.6
	candesartan	114.3 ± 2.9*	3.59 ± 0.13*	1.30 ± 0.08*	36.93 ± 3.2
	post-treatment	107.0 ± 4.0*+	3.25 ± 0.30*	1.26 ± 0.09*	41.00 ± 6.6
0.5+25 (n=5)	control	123.3 ± 2.2	4.06 ± 0.20	1.36 ± 0.04	35.68 ± 2.2
	candesartan	106.2 ± 2.0*	3.50 ± 0.19*	1.19 ± 0.02*	35.70 ± 1.3
	post-treatment	99.8 ± 1.8*+	2.86 ± 0.32*	1.12 ± 0.06*	43.39 ± 6.2
1.0+50 (n=5)	control	138.2 ± 6.0	3.98 ± 0.25	1.37 ± 0.09	37.82 ± 3.2
	candesartan	120.6 ± 5.3*	2.96 ± 0.18*	1.20 ± 0.09*	38.02 ± 4.2
	post-treatment	108.1 ± 6.1*+	2.83 ± 0.26*	1.14 ± 0.10*	45.48 ± 8.9

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M.

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วงเวลา control ภายในกลุ่มเดียวกัน (P<0.05)

+ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วงเวลา candesartan ภายในกลุ่มเดียวกัน

(P<0.05)

ตารางที่ 2 แสดงค่า urinary sodium excretion ($U_{Na}V$), fractional sodium excretion (FE_{Na}), urinary potassium excretion (U_KV) และ fractional potassium excretion (FE_K) ของหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan

candesartan ($mg\ kg^{-1} + \mu g\ kg^{-1}\ min^{-1}$)	experimental period	$U_{Na}V$ ($\mu mol\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	FE_{Na} (%)	U_KV ($\mu mol\ min^{-1}\ gkw^{-1}$)	FE_K (%)
0.1 + 0.5 (n=7)	control	2.88 ± 0.4	1.49 ± 0.2	0.72 ± 0.06	15.02 ± 1.2
	candesartan	$5.03 \pm 0.9^*$	$2.76 \pm 0.6^*$	0.82 ± 0.06	$19.03 \pm 2.2^*$
	post-treatment	$4.86 \pm 0.62^*$	$2.8 \pm 0.46^*$	0.70 ± 0.09	17.56 ± 2.8
0.2 + 10 (n=5)	control	2.78 ± 0.3	1.26 ± 0.1	0.66 ± 0.07	12.07 ± 0.8
	candesartan	$4.47 \pm 0.6^*$	$2.41 \pm 0.2^*$	$0.93 \pm 0.16^*$	$19.96 \pm 2.9^*$
	post-treatment	$5.45 \pm 0.4^*$	$3.23 \pm 0.1^{*+}$	0.68 ± 0.09	15.32 ± 1.9
0.5+25 (n=5)	control	2.52 ± 0.23	1.22 ± 0.09	0.65 ± 0.03	12.30 ± 0.8
	candesartan	$4.37 \pm 0.26^*$	$2.52 \pm 0.2^*$	$0.86 \pm 0.07^*$	$20.24 \pm 1.2^*$
	post-treatment	$5.84 \pm 0.59^*$	$3.62 \pm 0.2^{*+}$	0.75 ± 0.08	$19.05 \pm 2.2^*$
1.0+50 (n=5)	control	2.96 ± 0.52	1.50 ± 0.2	0.64 ± 0.06	13.41 ± 1.5
	candesartan	$5.83 \pm 1.18^*$	$3.40 \pm 0.5^*$	$0.94 \pm 0.13^*$	$23.27 \pm 2.8^*$
	post-treatment	$6.74 \pm 1.1^*$	$3.93 \pm 0.4^*$	0.75 ± 0.12	19.99 ± 2.6

ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M.

* แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วงเวลา control ภายในกลุ่มเดียวกัน

($P < 0.05$)

+ แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วงเวลา candesartan ภายในกลุ่มเดียวกัน

($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงค่า urine flow rate (V), lithium clearance (C_{Li}), fractional lithium excretion FE_{Li} และ fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}) ของหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan

candesartan ($mg\ kg^{-1} + \mu g\ kg^{-1}\ min^{-1}$)	experimental periods	V ($\mu l\ min^{-1}\ g\ kw^{-1}$)	C_{Li} ($ml\ min^{-1}\ g\ kw^{-1}$)	FE_{Li} (%)	FPR_{Na} (%)
0.1 + 0.5 (n=7)	control	23.92 ± 3.27	0.42 ± 0.02	32.42 ± 1.6	67.57 ± 1.6
	candesartan	41.69 ± 7.56*	0.58 ± 0.04*	46.72 ± 1.8*	53.28 ± 1.8*
	post-treatment	39.14 ± 5.54*	0.45 ± 0.05	39.74 ± 3.4	60.25 ± 3.3 ⁺
0.2 + 10 (n=5)	control	15.55 ± 2.84	0.42 ± 0.02	28.70 ± 1.6	71.29 ± 1.6
	candesartan	20.56 ± 2.93	0.58 ± 0.06*	43.62 ± 1.9*	56.37 ± 1.9*
	post-treatment	30.42 ± 2.69*	0.47 ± 0.06	36.05 ± 2.8	64.82 ± 2.9 ⁺
0.5+25 (n=5)	control	18.51 ± 2.54	0.40 ± 0.04	29.36 ± 0.9	70.64 ± 1.8
	candesartan	28.86 ± 2.16*	0.56 ± 0.04*	46.48 ± 2.5*	53.5 ± 2.52*
	post-treatment	34.85 ± 2.80*	0.42 ± 0.04	35.8 ± 3.0	64.1 ± 2.2*
1.0+50 (n=5)	control	16.46 ± 3.74	0.45 ± 0.06	32.18 ± 2.2	67.82 ± 2.2
	candesartan	29.14 ± 6.80*	0.64 ± 0.08*	54.29 ± 3.4*	47.24 ± 3.6*
	post-treatment	34.13 ± 5.33*	0.63 ± 0.08*	52.24 ± 4.7*	49.84 ± 3.4*

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M.

* แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วงเวลา control ภายในกลุ่มเดียวกัน

($P < 0.05$)

+ แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วงเวลา candesartan ภายในกลุ่มเดียวกัน

($P < 0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงค่า P_{PFS} , P_{PAH} , P_{Na^+} , P_K และ P_{Li} ของแต่ละช่วงเวลาการทดลองในหนูกลุ่มที่ได้รับ candesartan

candesartan group ($\text{mg kg}^{-1} + \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	experimental periods	P_{PFS} ($\text{mg}\%$)	P_{PAH} ($\text{mg}\%$)	P_{Na^+} (mmol l^{-1})	P_{K^+} (mmol l^{-1})	P_{Li^+} (mmol l^{-1})
0.1 + 0.5 (n=7)	control	110.0 ± 4.5	1.22 ± 0.8	142.1 ± 1.0	3.5 ± 0.06	0.2 ± 0.02
	candesartan	109.2 ± 4.8	1.14 ± 0.07	141.1 ± 0.8	3.4 ± 0.1	0.2 ± 0.02
	post-treatment	107.2 ± 5.2	1.15 ± 0.08	142.2 ± 1.4	3.5 ± 0.1	0.2 ± 0.02
0.2 + 10 (n=5)	control	109.6 ± 5.0	1.03 ± 0.1	137.4 ± 1.0	3.5 ± 0.06	0.30 ± 0.006
	candesartan	101.3 ± 3.5	1.03 ± 0.09	138.3 ± 1.6	3.5 ± 0.06	0.30 ± 0.006
	post-treatment	97.4 ± 2.8	0.99 ± 0.1	137.7 ± 1.6	3.4 ± 0.06	0.30 ± 0.006
0.5+25 (n=5)	control	104.8 ± 3.6	0.90 ± 0.04	145.7 ± 4.8	3.6 ± 0.07	0.10 ± 0.10
	candesartan	97.6 ± 4.4	0.80 ± 0.05	146.6 ± 5.2	3.6 ± 0.04	0.10 ± 0.10
	post-treatment	97.8 ± 4.4	0.82 ± 0.04	144.0 ± 1.6	3.6 ± 0.06	0.10 ± 0.10
1.0+50 (n=5)	control	108.9 ± 8.4	1.02 ± 0.1	140.8 ± 0.8	3.5 ± 0.05	0.10 ± 0.10
	candesartan	110.0 ± 8.8	0.89 ± 0.09	140.9 ± 0.8	3.5 ± 0.08	0.20 ± 0.10
	post-treatment	112.9 ± 7.6	0.90 ± 0.9	140.6 ± 0.8	3.5 ± 0.10	0.10 ± 0.10

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว ศิริวรรณ แซ่เตียว

วัน เดือน ปีเกิด 27 มิถุนายน 2513

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ประกาศนียบัตรพยาบาลศาสตร์	วิทยาลัยพยาบาล สงขลา	2536