PDF4380064 ผศ.ดร. ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การควบคุมการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้นโดยแองจิโอแทนซิน II

Regulation of renal proximal fluid reabsorption by angiotensin II

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กันยายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การควบคุมการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้นโดยแองจิโอแทนซิน II

Regulation of renal proximal fluid reabsorption by angiotensin II

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กันยายน 2546

สัญญาเลขที่ PDF/64/2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การควบคุมการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้นโดยแองจิโอแทนซิน II

Regulation of renal proximal fluid reabsorption by angiotensin II

โดย

นางศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยให้บรรลุวัตถุประสงค์ทุกประการ

เทคนิคที่ใช้ในการทดลองนี้คือ computerized video-based method for digital image capture and analysis of shrinking split-drop micropuncture ที่ใช้วัดค่าอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ของไตหนูได้ดำเนินการเรียบร้อยในห้องปฏิบัติการภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใต้ความร่วมมือของ Professor Peter J. Harris, Department of Physiology, The University of Melbourne ประเทศออสเตรเลีย โดยการบริจาคเครื่อง micromanipulator, computer software และอุปกรณ์ย่อยอื่นๆ อีกหลายชนิด และยังเป็น mentor ในโครงการวิจัยเรื่องนี้ จึงขอขอบคุณไว้ ณ.ที่นี้

ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติชาดา

กันยายน 2546

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA43-8-0013
ชื่อโครงการ : การควบคุมการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้นโดยแองจิโอแทนซิน II
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติชาดา
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
E-mail Address : hsiriphu@ratree.psu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : ตุลาคม 2453 – กันยายน 2545

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาการควบคุมการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้นโดยฮอร์โมนแองจิโอแทนซิน II จากภายในท่อไตและจากด้านเส้นเลือดฝอย

วิธีการทดลอง : การทดลองทำในหนูขาวใหญ่พันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักตัว 190-290 กรัม ทำให้สัตว์ทดลองสลบโดยใช้ฉีด inactin (110 มล./กก) เข้าทางช่องท้อง ให้สารละลาย 0.9% NaCl ทางหลอดเลือดดำด้วยอัตรา 1.6 มล/ชม/น้ำหนักตัว 100 กรัม วัดความดันเลือดแดงตลอดการทดลอง ทำการเปิดไตด้านซ้ายเพื่อวัดอัตราการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้นโดยใช้เทคนิค shrinking split droplet micropuncture โดยใช้ double-barreled micropipette ฉีดสารละลาย sudan black เข้าในท่อไตส่วนต้นจากนั้นจึงฉีดสารละลาย artificial tubular fluid แทรกเข้าไป และคำนวณค่าอัตราการดูดกลับด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ การยับยั้งการทำงานของแองจิโอแทนซิน II ทางด้านภายในท่อและด้านหลอดเลือดฝอย ทำโดยฉีดสารละลาย 10^{-8} M candesartan การให้สารละลายทางหลอดเลือดฝอยใช้ single-barreled micropipette

ผลการทดลอง

	Jv_s ($\times 10^{-4} mm^3 mm^{-2} s^{-1}$)	Jv_s ($\times 10^{-4} mm^3 mm^{-2} s^{-1}$)		
	ค่าเริ่มต้น	ด้านภายในท่อ	ด้านหลอดเลือดฝอย	% การลดลง
กลุ่ม 1 (n = 15)	2.94 ± 0.17	ไม่มี AT_1 antagonist	ไม่มี AT_1 antagonist	27.3*
		2.10 ± 0.12		
กลุ่ม 2 (n = 8)	3.02 ± 0.18	10^{-8}M candesartan	ไม่มี AT_1 antagonist	27.8*
		2.14 ± 0.11		
กลุ่ม 3 (n = 6)	3.26 ± 0.19	ไม่มี AT_1 antagonist	10^{-8}M candesartan	32.8*
		2.22 ± 0.30		
กลุ่ม 4 (n = 6)	3.51 ± 0.16	10^{-8}M candesartan	10^{-8}M candesartan	43.1*
		1.99 ± 0.12		

ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดมาตรฐาน ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่า initial และกลุ่ม 2 แสดงโดย
* $P<0.05$ และ # $p < 0.05$ (Student's paired and unpaired t-test ตามลำดับ).

สรุปผลการทดลอง : การดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้น มีค่าลดลง 27 และ 43% เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น เมื่อฮอร์โมนแองจิโอเทนซิน II จากภายในท่อไตและด้านหลอดเลือดฝอยถูกยับยั้งโดย candesartan ผลการทดลองนี้สรุปว่าแองจิโอแทนซิน II ทั้งในกระแสเลือดและที่สร้างจากท่อไตฝอยส่วนต้นมีความสำคัญร่วมกันในกระบวนการที่ทำให้การดูดกลับของเหลวเกิดได้อย่างสูงสุดที่ท่อไตส่วนนี้

คำหลัก : การดูดกลับของเหลวที่ท่อไตฝอยส่วนต้น, candesartan, shrinking split-drop micropuncture

Abstract

Project Code : RSA43-8-0013
Project Title : Regulation of renal proximal fluid reabsorption by angiotensin II
Investigator : Assistant Professor Dr. Siriphun Hiranyachattada
Department of Physiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University
E-mail Address : hsiriphu@ratree.psu.ac.th
Project period : October 2000 – September 2002

Objective: To investigate the regulation of renal proximal fluid reabsorption by luminal (locally produced) and peritubular capillary (circulatory) level of angiotensin II (ANGII) using a selective angiotensin receptor antagonist (candesartan).

Methods: Male Wistar rats (BW 190-290g) were anaesthetized with Inactin (110 mg/kg, i.p.) Saline (0.9% NaCl) was infused intravenously (1.6 ml/hr per 100 g BW) and carotid pressure monitored. The left kidney was exposed and shrinking-split droplet microperfusion was performed in proximal tubules by injecting Sudan Black stained castor oil from a double-barreled micropipette. The oil column was then split by injection of an artificial tubular fluid solution (in mM: NaCl 145; $NaHCO_3$ 5; KCl 5 and $CaCl_2$ 1.5) as vehicle control or with similar solution containing 10^{-8} M candesartan. Peritubular capillary perfusion was performed simultaneously with a single barreled micropipette containing a solution with plasma-like electrolyte composition (in mM: NaCl 98.3; $NaHCO_3$ 35; Na_2HPO_4 1.6; NaH_2PO_4 0.2; $CaCl_2$ 1.5; KCl 5; $MgCl_2$ 0.8 and CH_3COONa 10). Proximal tubular fluid reabsorption rate (Jv_a) was measured using computerized video-based method of digital image analysis.

Results:

	Jv_a ($\times 10^{-4} mm^3 mm^{-2} s^{-1}$)	Jv_a ($\times 10^{-4} mm^3 mm^{-2} s^{-1}$)		
	Initial	Luminal perfusion	Peritubular capillary perfusion	% decrease
Group 1 (n = 15)	2.94 ± 0.17	no AT_1 antagonist	no AT_1 antagonist	27.3*
		2.10 ± 0.12		
Group 2 (n = 8)	3.02 ± 0.18	10^{-8}M candesartan	no AT_1 antagonist	27.8*
		2.14 ± 0.11		
Group 3 (n = 6)	3.26 ± 0.19	no AT_1 antagonist	10^{-8}M candesartan	32.8*
		2.22 ± 0.30		
Group 4 (n = 6)	3.51 ± 0.16	10^{-8}M candesartan	10^{-8}M candesartan	43.1*
		1.99 ± 0.12		

Data are means ± S.E.M. * $p < 0.05$ compared with initial Jv_a values, # $p < 0.05$ compared with group 2 (Student's paired and unpaired t-test, respectively).

Conclusion: Fluid uptake rates decreased by between 27 and 43% during perfusion when compared with the corresponding initial values and this could be interpreted as removal of a stimulatory action of AngII. Perfusion of the lumen or capillaries with either artificial tubular solution or with the antagonist was effective in reducing fluid uptake. These results suggest that the presence of endogenous AngII in both peritubular blood and luminal fluid is important for maximal expression of the stimulatory influence of this peptide on fluid absorption.

Key words : proximal tubular fluid reabsorption, candesartan, shrinking split drop micropuncture

สารบัญเรื่อง

หน้า

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ..... 7
สารบัญรูป..... 9
สารบัญตาราง..... 10
บทนำ..... 11
วิธีดำเนินการทดลอง.....15
ผลการวิจัย..... 23
บทวิจารณ์.....29
หนังสืออ้างอิง.....34
Output จากโครงการ 37
ภาคผนวกที่ 1 38

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

μM	micromolar
$[Na^+]_i$	intracellular sodium ion concentration
5,6-EET	5,6,-epoxy-eicosatrienoic acid
AC	adenylyl cyclase
ACE	angiotensin I converting enzyme
ANF	atrial natriuretic factor
ANGII, AngII	angiotensin II
AT_1	angiotensin receptor type 1
AT_2	angiotensin receptor type 2
BW	body weight
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanine monophosphate
EIPA	ethylisopropyl amiloride
G_i	inhibitory G-regulatory protein
GTB	glomerulo-tubular balance
GTP	guanidine tri-phosphate
H^+	hydrogen ion
H_2-DIDS	dihydro-4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphuric acid
I.D.	internal diameter
i.p.	intra-peritoneal
i.v.	intra-venous
IC_{50}	50 percent inhibitory concentration
IP_3	inositol 1, 4, 5-triphosphate
J_{HCO3-}	bicarbonate flux
Jv	volume flux
Jv_a	volume flux per unit surface area
Jv_l	volume flux per unit length
K_d	dissociation coefficient
Kda, kDa	kilodalton
M	molar
MABP	mean arterial blood pressure
Na^+	sodium ion
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
NHE	sodium hydrogen exchanger
nM	nanomolar
O.D.	outside diameter

P_{450}	cytochrome P_{450}
PGTB	proximal glomerulo-tubular balance
PIP_2	phosphatidylinositol-4,5,-biphosphate
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PL	phospholipids
PLA	phospholipase A
PLA_2	phospholipase A_2
PLC	phospholipase C
pM	picomolar
PTF	peritubular fluid
PTH	parathyroid hormone
SD	Sprague Dawley rat
SHR	spontaneously hypertensive rat
TF	tubular fluid
WKY	Wistar Kyoto rat

สารบัญรูป

รูปที่ 1 Model for the cellular mechanism of the stimulatory action of low concentrations of angiotensin II (AngII) on sodium transport by proximal tubule cells 13

รูปที่ 2 Model for the cellular mechanism of the inhibitory action of high concentrations of angiotensinII (AngII) on sodium transport by proximal tubule cells 14

รูปที่ 3 Schematic representation of the method of shrinking split-drop micropuncture (top panel) and with simultaneous perfusion of peritubular capillaries (bottom panel)..... 18

รูปที่ 4 Schematic representation of digital image capture and analysis 19

รูปที่ 5 Successive stages in the capture and analysis of a single frame from a shrinking split-drop sequence 20

รูปที่ 6 Relation between percentage changes in proximal tubular reabsorption rate with simultaneous peritubular capillary perfusion and initial values for Jv_a..... 24

รูปที่ 7 Relation between percentage changes in proximal tubular reabsorption rate with luminal addition of 10^{-8}M candesartan and with luminal addition of 10^{-8}M candesartan plus simultaneous peritubular capillary perfusion and initial values for Jv_a 26

รูปที่ 8 Relation between percentage changes in proximal tubular reabsorption rate with 1) simultaneous capillary perfusion (open circle), 2) luminal addition of 10^{-8}M candesartan (solid triangle) and with 3) luminal addition of 10^{-8}M candesartan plus simultaneous peritubular capillary perfusion (solid square) and initial values for Jv_a 32

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 Comparison of mean values (± s.e.m.) for diameter, reabsorptive half time ($t_{1/2}$), volume flux and mean arterial blood pressure (MABP) in control (non-perfused) and simultaneous peritubular capillary perfusion experiments..... 23

ตารางที่ 2 Effect of luminal addition of 10^{-8}M candesartan and luminal addition of 10^{-8}M candesartan plus simultaneous peritubular capillary perfusion (PTF)..... 25

ตารางที่ 3 Effect of simultaneous peritubular capillary perfusion (PTF) of 10^{-8}M candesartan on proximal fluid reabsorption (Jv_a) 27

ตารางที่ 4 Effect of luminal addition of 10^{-8}M candesartan and luminal addition of 10^{-8}M candesartan plus simultaneous peritubular capillary perfusion (PTF) of 10^{-8}M candesartan on proximal tubular fluid reabsorption (Jv_a)..... 28

บทนำ

ท่อไตส่วนต้น (proximal tubule) มีหน้าที่หลักประการหนึ่งในการดูดกลับสารละลายและน้ำ ปริมาณการดูดกลับที่ท่อไตส่วนนี้ประมาณได้เป็น 70% ของสารละลายที่ถูกกรองผ่าน glomeruli ออกมา นอกจากนี้ท่อไตส่วนนี้ยังสามารถปรับปริมาณการดูดกลับของเหลวได้ตามการเปลี่ยนแปลงอัตราการกรอง ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า proximal glomerulo-tubular balance (PGTB) ดังนั้นการดูดกลับสารละลายที่ท่อไตส่วนต้นนี้จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำงานของไตโดยเฉพาะที่เกี่ยวกับการควบคุมองค์ประกอบของ extracellular fluid (ECF) volume ของร่างกาย

ในสัตว์ทดลองที่มีความดันโลหิตสูงแต่กำเนิด (spontaneously hypertensive rat, SHR) พบว่ามีการขับทิ้งเกลือโซเดียม (sodium excretion) ต่ำกว่าหนูความดันโลหิตปกติ (Ader et al., 1987; Beierwaltes et al., 1982; Dietz et al., 1978; Herlitz et al., 1983) นอกจากนี้ SHR ยังมีปริมาณเกลือโซเดียมสะสมในร่างกายมากกว่าหนูที่มีปกติในช่วงอายุเท่ากัน (Harrap & Doyle, 1985) จึงอาจเป็นไปได้ว่าภาวะความดันโลหิตสูงอาจเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของท่อไตในการดูดกลับเกลือโซเดียม

การควบคุมกระบวนการดูดกลับที่ท่อไตส่วนต้นประกอบด้วยหลายปัจจัย เช่น peritubular physical fators, intraluminal factors, neural control, hormonal factors และ endothelial derived nitric oxide ในส่วนของปัจจัยที่เป็นฮอร์โมนนั้น เป็นที่ทราบแล้วว่าฮอร์โมนแองจิโอเทนซิน II หรือ AngII มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการดูดกลับเกลือแร่โดยเฉพาะโซเดียมและน้ำที่ท่อไตส่วนต้น มีรายงานการออกฤทธิ์ของ AngII ระหว่าง ค.ศ. 1977-1991 ว่าเป็นไปได้ทั้งกระตุ้นและยับยั้งการดูดกลับโซเดียมและน้ำ (Harris & Young, 1977; Liu & Cogan, 1986; Spinelli & Walther, 1979; Schuster et al., 1984: Wang & Chang, 1987, 1991) โดย AngII (ไม่ว่าจะให้ทาง luminal หรือ peritubular side) ที่ความเข้มข้นต่ำ (10^{-12} - 10^{-9} M) จะมีผลกระตุ้นแต่ที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 10^{-9} M) จะมีผลยับยั้ง (Harris & Young, 1977) การทดลองดังกล่าวจะทำโดยให้ AngII จากภายนอก (exogenous) เข้าไป ส่วนการศึกษาผลของ AngII ที่มีในระบบไหลเวียนโลหิตอยู่แล้ว (endogenous or circulating) ทำได้โดยอาศัยการให้ angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor หรือให้ AngII receptor antagonist ซึ่งการศึกษาแบบนี้ผลของสารที่ให้เข้าไปดังกล่าวอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต (blood pressure) และ renal hemodynamics ซึ่งจะส่งผลต่อเนื่องโดยบดบังผลที่แท้จริงของ AngII ต่อการดูดกลับโซเดียมและน้ำที่ท่อไตส่วนนี้ (Cervenka et al., 1998) อนึ่งมีรายงานว่า ในหนู SHR ขณะที่กำลังเจริญเติบโตในช่วงอายุ 5-12 สัปดาห์ ฮอร์โมน AngII มีผลทำให้อัตราการดูดกลับโซเดียมและน้ำที่ท่อไตส่วนต้นเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูความดันปกติที่อายุเท่ากัน (Thomas et al., 1990) ซึ่งลักษณะนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณโซเดียมในร่างกายของหนู SHR ได้

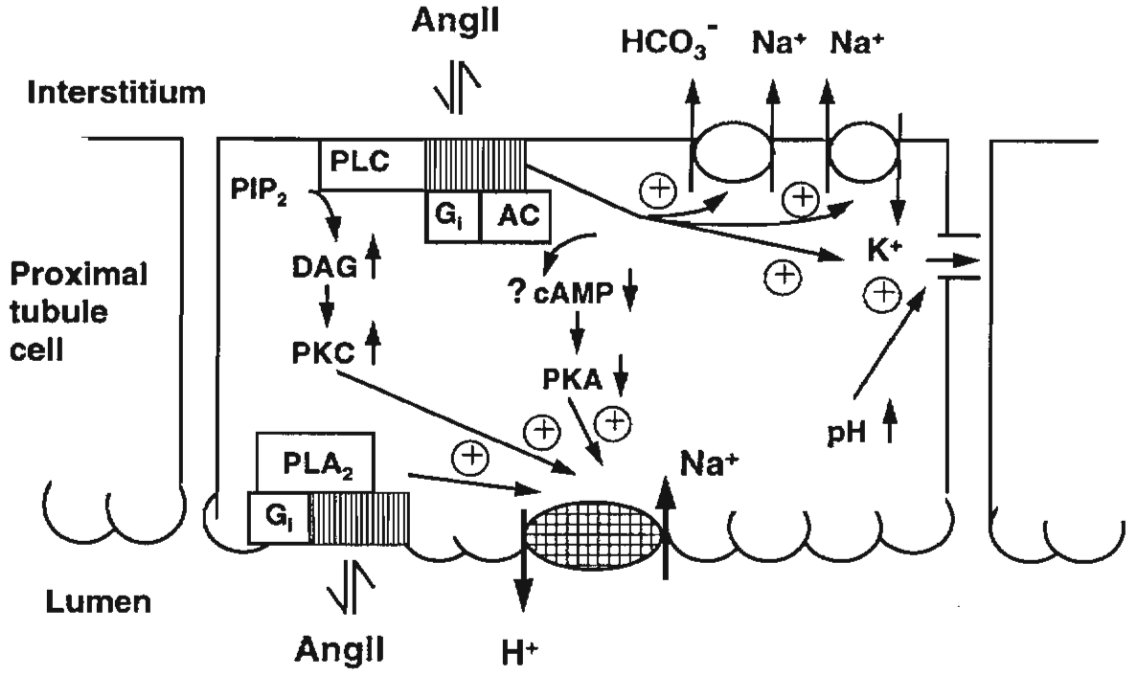
กลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของ AngII ที่ความเข้มข้นต่ำและที่ความเข้มข้นสูงนี้จะแตกต่างกันโดยเฉพาะในส่วนของ intracellular messenger อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า final common pathway ของการออกฤทธิ์ของ AngII ที่ท่อไตส่วนต้นนี้คือ luminal sodium hydrogen exchanger หรือ NHE ดังแสดงในรูปที่ 1และ รูปที่ 2

ปัจจุบันมีการแบ่ง angiotensin receptor ของเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกายออกได้ไม่ต่ำกว่า 4 ชนิดตาม selective antagonists ต่างๆ สำหรับที่ท่อไตส่วนต้น มีรายงานว่า receptor ที่พบมากคือ ชนิด AT_1 (Gibson et al., 1991; Hiranyachattada & Harris, 1996; Smart et al., 1999; Wong et al., 1991; Xie et al., 1990; Zhou et al., 1994) ซึ่ง selective antagonists ที่ใช้ศึกษาได้แก่ losartan (DuP753), EXP3174, candesartan (CV11974)

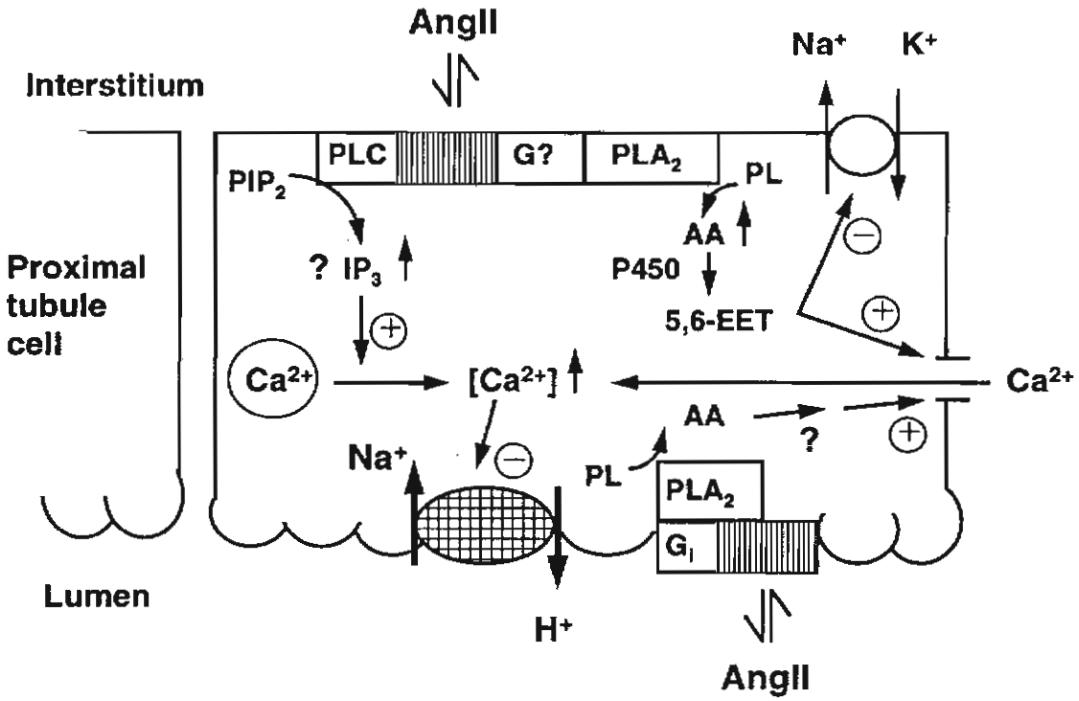
AngII ที่ออกฤทธิ์ที่ท่อไตส่วนต้นนี้นอกจากจะสร้างจากระบบไหลเวียนโลหิตแล้วยังมาจากการสร้างที่ไตเอง ที่ท่อไตส่วนต้นมีรายงานการสร้าง AngII ในลักษณะที่เป็น autocrine หรือ paracrine ที่มาควบคุมกระบวนการดูดกลับโซเดียมและน้ำ ความเข้มข้นของ AngII ภายในท่อไตส่วนต้นวัดได้เป็น nanomolar ซึ่งมากกว่าใน peritubular capillary ซึ่งวัดได้เป็น picomolar ถึง 100-1000 เท่า (Seikaly et al., 1990) ความแตกต่างของความเข้มข้นของ AngII ระหว่าง lumen และ peritubular capillary นี้น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการออกฤทธิ์ของ AngII ที่ท่อไตส่วนต้น ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานว่าระดับ AngII ใน lumen (locally produced level) หรือใน peritubular capillary (circulatory level) จะออกฤทธิ์แตกต่างกันอย่างไรต่ออัตราการดูดกลับของเหลว การวิจัยครั้งนี้จะทำให้ทราบกลไกการทำงานของ AngII ต่อการดูดกลับโซเดียมและน้ำที่ท่อไตส่วนนี้มากขึ้น และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการอธิบายสมมุติฐานของการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงที่เกิดจากการคั่งค้างของโซเดียมในร่างกายด้วย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน AngII ใน lumen (locally produced level) ของ renal proximal tubule และใน peritubular capillary (circulatory level) ต่อการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้น (proximal fluid reabsorption) การยับยั้งการทำงานของ AngII ทำโดยใช้ candesartan ซึ่งเป็น AngII receptor antagonist ที่จำเพาะเจาะจงกับตัวรับชนิด AT_1 ส่วนวิธีการวัดอัตราการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้น ใช้เทคนิค computerized video-based method of digital image capture and analysis of shrinking split-drop micropuncture



รูปที่ 1 Model for the cellular mechanism of the stimulatory action of low concentrations of angiotensin II (AngII) on sodium transport by proximal tubule cells. Angiotensin receptors occur on both basolateral and brush border membranes. Basolateral receptors are coupled via G-proteins to adenylyl cyclase (AC) and phospholipase C (PLC), which form the second messengers cAMP and diacylglycerol (DAG), resulting in a decrease in cAMP which reduces activation of the protein kinase A (PKA) and activation of protein kinase C (PKC). PKA is inhibitory to Na^+/H^+ exchange and the reduction in PKA activity results in stimulation of this luminal transporter. Activation of PKC results in stimulation of Na^+/H^+ exchange. Stimulation of sodium entry into the cell is accompanied by increased sodium efflux via the basolateral Na^+/K^+-ATPase and Na^+—HCO_3^- cotransporter and by increased K^+ effux via a pH dependent K^+ channel. Brush border AngII receptors appear to be coupled more directly to activation of the luminal Na^+/H^+ exchanger via a G-protein and phospholipase A_2 (PLA_2) activation (from Harris *et al.*, 1996)



รูปที่ 2 Model for the cellular mechanism of the inhibitory action of high concentrations of angiotensin II (AngII) on sodium transport by proximal tubule cells. The controlling step involves inhibition of a luminal Na^+/H^+ exchanger. Angiotensin binds to basolateral receptors coupled to phospholipase C (PLC) and phospholipase A_2 (PLA_2). Inositol-1,4,5-triphosphate formed by PLC is proposed to release Ca^{2+} from intracellular stores resulting in inhibition of Na^+/H^+ exchange. Phospholipase A_2 releases the epoxide 5,5-EET from arachidonic acid, which then increases Ca^{2+} entry through basolateral Ca^{2+} channels. The luminal AngII receptor is coupled via a G-protein and PLA_2 and may also act via arachidonic acid metabolites to alter intracellular Ca^{2+} levels (from Harris *et al.*, 1996)

วิธีดำเนินการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การทดลองนี้จะทำในหนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Wistar เพศผู้น้ำหนักตัวระหว่าง 190-290 กรัม จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยทำให้สลบก่อนด้วยการฉีด Inactin (RBI, USA) ขนาด 110 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จากนั้นจึงนำมาวางบนเตียงที่ควบคุมอุณหภูมิร่างกายให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส เจาะคอและสอดท่อหายใจ วัดความดันโลหิตแดงทาง carotid artery และให้ 0.9%NaCl ทาง jugular vein ในอัตรา 1.6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จากนั้นทำการสอดท่อผ่านกระเพาะปัสสาวะเพื่อระบายปัสสาวะออก แล้วจึงเปิดหาไตด้านซ้าย ลอกไขมันและผนังหุ้มออกนำมาวางใน kidney cup สอดท่อเข้า ureter ซ้ายเพื่อระบายปัสสาวะ และป้องกันการขยับไปมาของไตในขณะสัตว์ทดลองหายใจด้วยการเท 3% agar ที่ละลายใน 0.9%NaCl ขณะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงไปใน kidney cup หลังจากที่ agar แข็งตัวแล้วจึงตัดผิวด้านบนออกเพื่อส่องหา proximal tubule ด้วยกล้อง stereomicroscope แล้วจึงเริ่มทำการทดลอง

หลังจากเสร็จการทดลองแล้ว ใช้ KCl ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อให้สัตว์ทดลองเสียชีวิต

การเตรียม micropipettes สำหรับทำวิธี micropuncture

ทั้ง single และ double barrelled micropipette เตรียมจาก borosilicate glass capillary tubes (TGC 100-15 และ TGC 150-15, Harvard Apparatus, England) โดยเริ่มจากทำความสะอาดโดยต้มในน้ำกลั่นจนเดือดและทำให้แห้งโดยการอบ จากนั้นทั้ง single และ double barrelled micropipette นำมาดึงยืดออกโดยใช้ micropipette puller (Model PE-2, Narishige, Japan) โดยปรับค่า heater และ magnet ให้เหมาะสมกับขนาดที่จะใช้งานแล้วจึงนำมา grind โดยใช้เครื่อง micropipette beveller ภายใต้กล้อง binocular microscope (Model 14168, WPI, USA) โดยให้มีหยดน้ำไหลบนแผ่นหินขัดอย่างต่อเนื่องเพื่อขจัดฝุ่นและเศษแก้ว จนกระทั่ง ได้ single barrelled micropipette ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-10 μm และ double barrelled micropipette ขนาด 10-13 μm ซึ่งจะถูกนำมาทำความสะอาดที่ส่วนปลายแหลมโดยใช้ chromic-sulfuric solution, distilled water และทำให้แห้งโดย acetone ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจะทำให้มนโดยผ่านเปลวไฟเพื่อเตรียมไว้ต่อกับท่อ polyethylene เพื่อบรรจุสารละลายที่ต้องการทำการทดลอง

ในการบรรจุสารละลายลงใน double barrelled micropipette ต้องใช้ข้อต่อที่ทำจาก glass micropipette (GCi 50-15, Harvard Apparatus, England) โดยนำมาดึงยืดในเปลวไฟด้วยมือ และตัดให้ได้ขนาดที่จะสอดเข้าไปใน double barrelled micropipette ทั้งสองข้างโดยยึดให้ติด

กันด้วยขี้ผึ้งลนไฟและรอจนแห้งยึดติดกันสนิท ข้างหนึ่งของ double barrelled micropipette จะถูกบรรจุโดย sudan black ที่ละลายใน castor oil ส่วนอีกด้านจะเป็นสารละลายที่ต้องการทดสอบ

สารละลายที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดก่อนที่จะถูกบรรจุใน single และ double barrelled micropipette ต้องผ่านการกรองโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 μm ส่วน sudan black ที่ละลายใน castor oil ใช้ขนาด 0.4 μm

วิธีทดลองโดยเทคนิค split droplet micropuncture

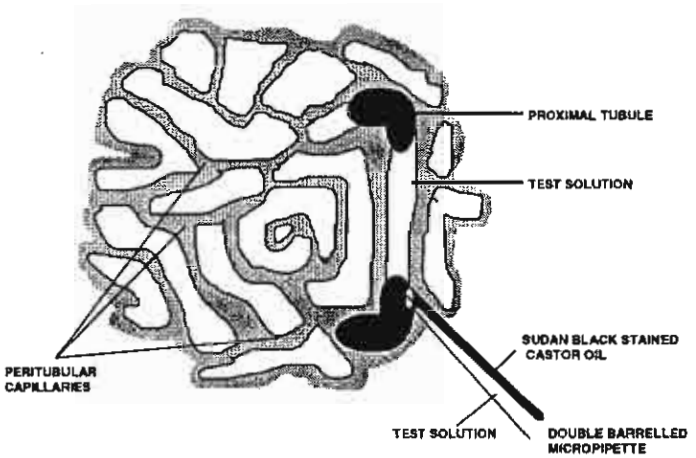
หลังจากเลือก proximal tubule ของ superficial nephron ที่จะทำการทดลองได้แล้ว นำ double barrelled micropipette ที่ด้านหนึ่งบรรจุ sudan black ที่ละลายใน castor oil และอีกด้านหนึ่งบรรจุสารละลายที่เป็น control หรือ mid-proximal tubular fluid (TF) ที่ประกอบด้วย (in mM) NaCl 145; $NaHCO_3$ 5; KCl 5 and $CaCl_2$ 1.5) pH 7.4 สำหรับ double barrelled micropipette ที่บรรจุสารทั้งสองด้านไว้แล้วจะถูกวางไว้บน micromanipulator (Leica, Switzerland) การฉีดสารละลาย sudan black ที่ละลายใน castor oil เข้าสู่ proximal tubule ทำโดยใช้ micrometer ส่วนการฉีดสารละลายที่ต้องการทดสอบทำโดยใช้การอัดอากาศผ่าน glass syringe ขนาด 50 ml โดยฉีดให้ oil column มีความยาวประมาณ 20 เท่าของเส้นผ่าศูนย์กลางของ proximal tubule ก่อนทางด้าน distal ของท่อแล้วจึงแยก (split) oil column ด้วย TF หรือ test solution อื่นๆ (ดังแสดงในภาพบนของรูปที่ 4) ขณะที่สารละลายใน proximal tubule ถูกดูดกลับจะทำให้ oil column ที่ถูกแยกออกตอนแรกเคลื่อนเข้าหากัน ในขณะเดียวกันจะมีการบันทึกภาพ image ของ shrinking split-drop แบบ digital ไว้ทุกๆ 1 วินาที เพื่อนำมาวิเคราะห์และคำนวณค่าอัตราการดูดกลับของของเหลว

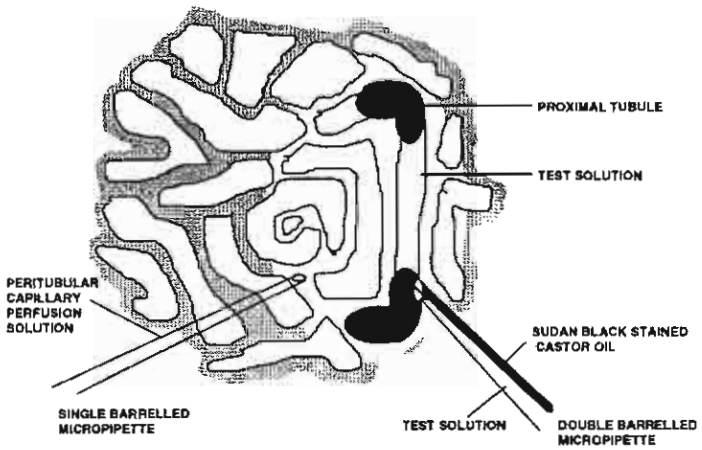
วิธีทดลอง peritubular capillary perfusion

ในการทดลองที่ศึกษาอัตราการดูดกลับของของเหลวจากปัจจัยที่เกิดจากด้าน peritubular fluid จะต้องมีเทคนิค peritubular capillary perfusion ร่วมอยู่กับเทคนิค shrinking split-droplet micropuncture โดยตอนแรกจะต้องฉีด oil column เข้าไปใน proximal tubule ก่อน แล้วจึงใช้ single barrelled micropipette ฉีดสารเข้าไปในเส้นเลือดฝอย (capillary) บริเวณ vascular star ที่ห่างจาก proximal tubule ที่จะทำการศึกษา 2 หรือ 3 เท่าของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง capillary (Spitzer & Windhager, 1972; Gyory, 1974; Sato, 1975) สารละลายที่ฉีดเข้าไปหรือ artificial peritubular fluid (PTF) of protein-free plasma-like composition ประกอบด้วย (in mM) NaCl 98.3; $NaHCO_3$ 35; Na_2HPO_4 1.6; NaH_2PO_4 0.2; KCl 5; $CaCl_2$ 1.5; $MgCl_2$ 0.8; and CH_3COONa 10 mM ที่ pH 7.4 โดยใช้ carbogen gas (5%CO_2 + 95%O_2) ที่ความดัน 10 psi เป็นตัวดันสารละลาย PTF ที่ถูกเติมใน single barrelled micropipette จนเต็มก่อนแล้วโดยการเปิด

value ที่ต่อกับถัง carbogen gas สำหรับ single barrelled micropipette ที่ใช้นี้จะถูกวางไว้บน micromanipulator (Leitz, Switzerland) ในการ perfuse เส้นเลือดฝอยนี้จะถือว่าสมบูรณ์เมื่อบริเวณรอบท่อ proximal tubule ที่ต้องการศึกษาไม่มีเลือดไหลผ่านได้เลย (ดังแสดงในภาพล่างของรูปที่ 3) หลังจาก perfuse เป็นเวลา 10 วินาทีแล้วจึงแยก oil column ที่ฉีดเข้าไปก่อนด้วยสารละลาย TF หรือสารละลาย TF ที่มี candesartan 10^{-8}M ขึ้นกับกลุ่มการทดลอง ในขณะที่สารละลายใน proximal tubule ถูกดูดกลับ ภาพ digital image จะถูกบันทึกไว้ทุก 1 วินาที อัตราการดูดกลับของเหลวหรือค่า initial Jv_a จะคำนวณจากค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองที่ perfuse ท่อ proximal tubule ด้วย TF ที่ถูกเลือกแบบ random จำนวน 2-4 ท่อ ในทำนองเดียวกันขณะที่มี peritubular capillary perfusion ด้วย PTF ค่าเฉลี่ยของ Jv_a ก็จะคำนวณได้จากการทดลองใน 2-5 ท่อ

รูปที่ 3 Schematic representation of the method of shrinking split-drop micropuncture (top panel) and with simultaneous perfusion of peritubular capillaries (bottom panel).

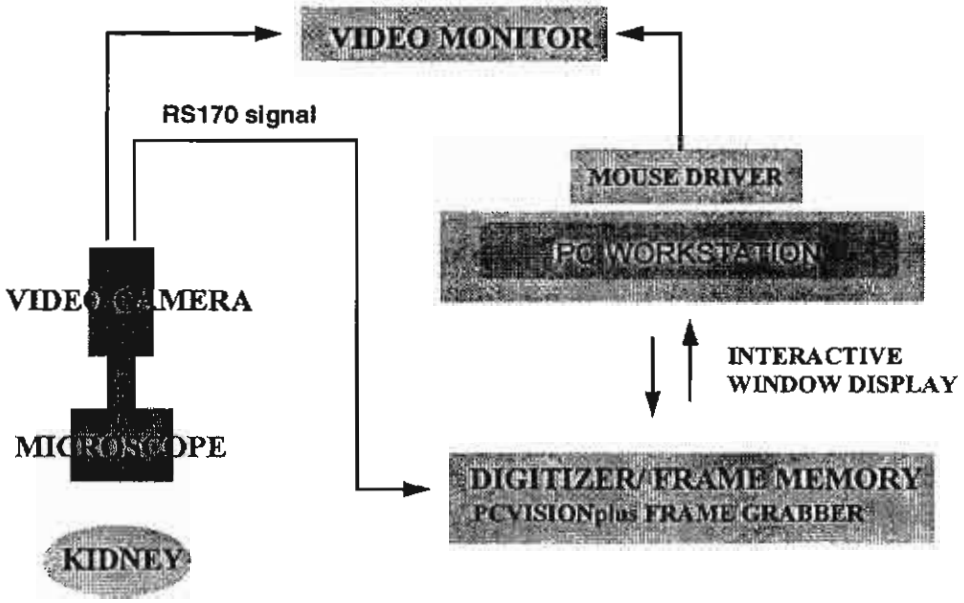




Digital image capture and analysis of shrinking split-drop micropuncture

ในการหาค่า proximal tubular fluid reabsorption ใช้เทคนิค video-based method for computerized digital image capture and analysis of shrinking split-drop micropuncture ซึ่งถูก modified โดย Harris *et al.* (1987) ดังแผนภาพที่แสดงในรูปที่ 4

รูปที่ 4 Schematic representation of digital image capture and analysis.



โดยหลังจากที่เตรียมไตสัตว์ทดลองเพื่อให้ได้ proximal tubule สำหรับทำ microperfusion แล้ว จะใช้กล้อง stereomicroscope (Model M420, Leica, Switzerland) ส่องดู proximal tubule ด้วยกำลังขยายรวมทั้งสิ้น 64 เท่า ส่วน phototube ของ stereomicroscope ต่อกับ video camera (Model JAI 1202, IAI Protec, Japan) โดยสัญญาณ RS 170 จาก video camera จะถูกแสดงบน video monitor และสัญญาณนี้ยังถูกผ่านไปยัง video digitizer และ frame memory (PCVISIONplus frame grabber, Imaging Technology Incorperated, USA) เพื่อเปลี่ยนสัญญาณ analog เป็น digital เพื่อการเก็บข้อมูล (stored images) ขนาด 512x512 pixels, 256 grey levels ในการเก็บและวิเคราะห์ digital images นั้นทำโดย computer program ที่เขียนด้วยภาษา C และ pascal บน MSDOS version 6.2 โดยเครื่อง PC