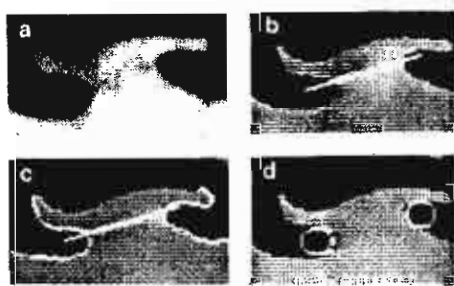


ขณะกำลังเก็บภาพ images นั้นโปรแกรมทำงานจะอยู่ในส่วน store sequence และด้วยการใช้ mouse กดเลือกขนาดภาพที่ต้องการบน monitor โดยเฉลี่ยมีขนาดประมาณ 5,000-8,000 pixels ครอบคลุมขนาดความยาวของท่อ proximal tubule ที่กำลังทดลอง ภาพ images จะถูกเก็บไว้ทุกๆ 1 วินาที หลังจากเก็บภาพที่ต้องการเป็นชุดของเวลาแล้ว จะนำมาคำนวณต่อไป โดยใช้โปรแกรมทำงานในส่วน verify sequence ซึ่งประกอบด้วยชุดโปรแกรมย่อยดังนี้ 1) edit sequence ใช้เพื่อเลือกเฉพาะ frame ที่ต้องการวิเคราะห์โดยเลือกส่วนที่เป็น straight portion ของ proximal tubule และต้องมีความยาวระหว่าง miniscus ของ oil column มากกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของ tubule 2) Find Boundary ใช้ในการหาขอบเขตของบริเวณปลาย oil column โดยใช้ boundary-tracking algorithm 3) Compute circles เป็นการใช้อัลกอริทึมสำหรับวาดวงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กที่สุดที่จะพอดีกับขนาดท่อ proximal tubule และ 4) Compute Data ใช้คำนวณข้อมูลแต่ละ frame ทั้งหมดที่ประกอบด้วย 4.1) ระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางของวงกลมที่ได้จากข้อ 3 มีหน่วยเป็น microns (μm), 4.2) ค่า half time ($t_{1/2}$) ของอัตราการลดลงของปริมาตรของ split-drop, 4.3) ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางและรัศมีของท่อ proximal tubule, 4.4) ค่า volume flux ต่อหน่วยพื้นที่ (Jv_a), และ 4.5) ค่า volume flux ต่อหน่วยความยาวท่อ (Jv_l) ตัวอย่างการเก็บภาพ image และการวิเคราะห์ภาพดังแสดงให้ดูในรูปที่ 5

รูปที่ 5 Successive stages in the capture and analysis of a single frame from a shrinking split-drop sequence. a) Photomicrograph showing droplet before image processing. b) Digital image retrieved from store after threshold processing. c) Limits of oil column defined by Find Boundaries program. d) Circles fitted to tips of oil columns by Calculate Circles program (from Harris *et al.*, 1987).



การแบ่งกลุ่มการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้จะทำในหนู 4 กลุ่มๆละ 6-8 ตัว โดยจะวัดอัตราการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้น (proximal tubular fluid reabsorption rate หรือ J_{v_a}) ค่า J_{v_a} จะเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากท่อไต 3-7 ท่อของหนูแต่ละตัว โดยฉีดสารเข้าสู่ lumen ของท่อไตพร้อมกับ peritubular capillary

สำหรับการศึกษา locally produced AngII ที่ proximal tubule และ circulating AngII ใน peritubular capillary ทำโดยใช้ highly potent and long-acting Ang II receptor antagonist คือ candesartan หรือ -CV11974 (25) โดยกำหนดแผนการทดลองดังนี้

	luminal perfusion	peritubular capillary perfusion
กลุ่มที่ 1	no Ang II blocker	no Ang II blocker
กลุ่มที่ 2	candesartan	no Ang II blocker
กลุ่มที่ 3	no Ang II blocker	candesartan
กลุ่มที่ 4	candesartan	candesartan

การคำนวณ

ค่า J_{v_a} ที่ได้จากการทดลองใน proximal tubule จำนวน 2-5 ท่อจะนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและแสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ s.e.m. (standard error of mean) ส่วนเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่า J_{v_a} จากผลของการทดลอง จะคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ change in } J_{v_a} = \frac{J_{v_a} (\text{test solution}) - J_{v_a} (\text{control TF solution})}{J_{v_a} (\text{control (TF) solution})} \times 100$$

ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากค่า initial J_{v_a} ขณะที่ มี peritubular capillary perfusion ด้วย PTF หรือ PTF + candesartan จะคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ change in } J_{v_a} = \frac{J_{v_a} (\text{PTF หรือ PTF+candesartan}) - J_{v_a} (\text{control TF solution})}{J_{v_a} (\text{control (TF) solution})} \times 100$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ Initial Jv_a จาก TF perfusion กับค่า Jv_a จาก TF+ candesartan หรือกับ PTF อย่างเดียว หรือกับ PTF+ candesartan ใช้ Student's paired t-test โดยจะถือว่ามีนัยสำคัญที่ P value น้อยกว่า 0.05

ในกรณีที่มีการทดลองมากกว่า 2 ประเภทในหนูตัวเดียว การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Jv_a จะใช้ two way ANOVA และทำ post hoc multiple comparison โดยใช้ Neuman-Keuls Method โดยจะถือว่ามีนัยสำคัญที่ P value น้อยกว่า 0.05

ผลการวิจัย

1. ผลของ simultaneous capillary perfusion ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 1)

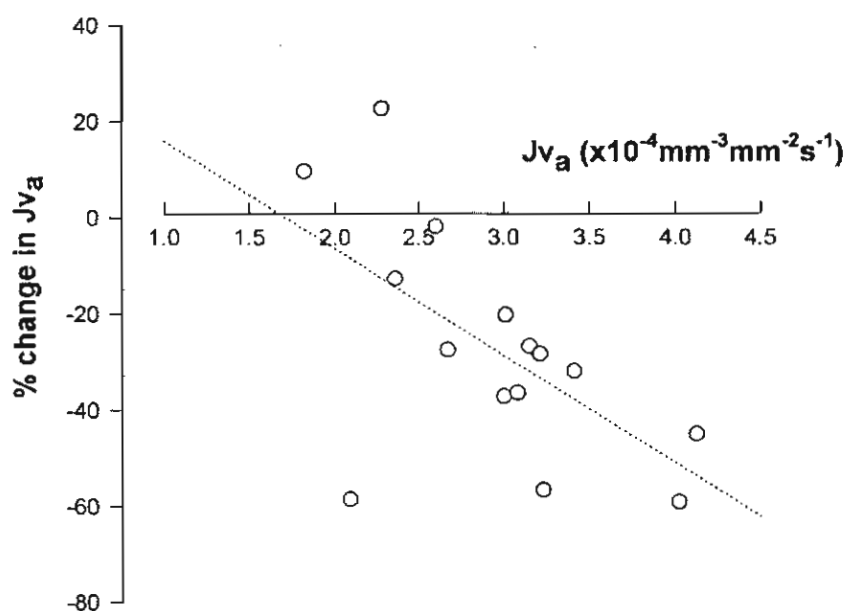
ผลของ simultaneous capillary perfusion ด้วยสารละลาย protein-free plasma-like peritubular fluid (PTF) ต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (J_{v_a}) ทำในหนูขาว พันธุ์ Wistar 15 ตัว น้ำหนักตัวระหว่าง 190-290 กรัม หาค่าเฉลี่ยของ J_{v_a} จากการ perfuse proximal tubule 2-3 ท่อ ด้วย mid-proximal tubular fluid (TF) และถือค่าจากการทดลองนี้เป็นค่า initial J_{v_a} value และหลังจากนั้นทำ simultaneous capillary perfusion และวัดค่า J_{v_a} จากการ perfuse proximal tubule อีก 2-5 ท่อ เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงผลที่อาจจะเกิดจากเวลาในการทดลอง จึงทำการทดลองหาค่าเฉลี่ยทั้งสองค่าโดยทำสลับก่อน-หลังในหนูกลุ่มนี้ จะเห็นว่า ค่าอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ต่อหน่วยพื้นที่ (J_{v_a}) และต่อหน่วยความยาว (J_{v_l}) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ ค่า reabsorptive half time ($t_{1/2}$) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ค่าเฉลี่ยของ J_{v_a} เมื่อทำ simultaneous capillary perfusion ลดลง 28% เมื่อเทียบกับที่ไม่ได้ทำ ในการทดลองนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางท่อและความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Comparison of mean values ($\pm$ 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.

	control (TF)	simultaneous capillary perfusion (PTF)	P value (Student's paired t-test)
Diameter (μm)	26.44 ± 0.30	26.91 ± 0.44	NS
$t_{1/2}$, (second)	17.22 ± 1.08	27.62 ± 2.51	< 0.001
J_{v_a} ($\times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2.94 ± 0.17	2.10 ± 0.12	< 0.001
J_{v_l} ($\text{nl mm}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	1.47 ± 0.09	1.07 ± 0.07	< 0.001
MABP (mmHg)	149 ± 9	149 ± 10	NS
Number of rat		15	
Body weight (g)		222 ± 7	

ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่า Jv_a เมื่อทำ simultaneous capillary perfusion กับค่า initial Jv_a แสดงในรูปที่ 6 ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย regression analysis พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า initial Jv_a และค่า %change in Jv_a ขณะทำ simultaneous capillary perfusion เป็นแบบ negative correlation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นที่ค่า initial Jv_a สูงๆ จะเกิดการลดลงของของ fluid uptake มากขึ้นด้วย

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



The line was obtained from regression analysis

Least square fit for 15 WKY (open circle) with simultaneous peritubular capillary perfusion :

$$\% \text{ change in } Jv_a = 38.3 - 22.3 Jv_a, r^2 = 36.3\% P < 0.05$$

2. ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan และ ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan with simultaneous peritubular capillary perfusion ที่มีต่ออัตราการดูดกลืนของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 2)

ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan และผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan with simultaneous peritubular capillary perfusion ที่มีต่ออัตราการดูดกลืนของเหลวที่ proximal tubule ทดลองในหนู 8 ตัว โดยการทำแบบสลับลำดับการทดลองเพื่อหลีกเลี่ยงผลของเวลา ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อทดลองโดยการเติม 10^{-8} M candesartan เข้าไปใน luminal tubular fluid พบว่าค่าเฉลี่ยของ J_{v_a} ลดลง 19% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่า control TF (TF, 3.02 ± 0.18 และ TF+ 10^{-8} M candesartan, $2.42 \pm 0.11 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) และในขณะที่ทำ luminal perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan ก็ทำ peritubular capillary perfusion รอบๆ ท่อ proximal tubule ที่ทำการทดลอง ด้วย protein-free plasma-like peritubular fluid (PTF) พบว่าค่าเฉลี่ยของ J_{v_a} ลดลงอีก 11% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากการเติม 10^{-8} M candesartan เข้าไปใน luminal tubular fluid และเมื่อเทียบกับค่า control TF พบว่ามีการลดลง 28% อย่างมีนัยสำคัญ (TF, 3.02 ± 0.18 และ 10^{-8} M candesartan + PTF, $2.14 \pm 0.11 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ช่วงการทดลอง

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) on proximal fluid reabsorption (J_{v_a})

	control (TF)	10^{-8} M candesartan in TF	10^{-8} M candesartan in TF + PTF
MABP (mmHg)	116 ± 5	118 ± 5	120 ± 4
$J_{v_a} (\times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2})$	3.01 ± 0.18	$2.42 \pm 0.11^{***}$	$2.14 \pm 0.11^{*** \#}$
Number of rat	8		
Body weight (g)	255 ± 8		

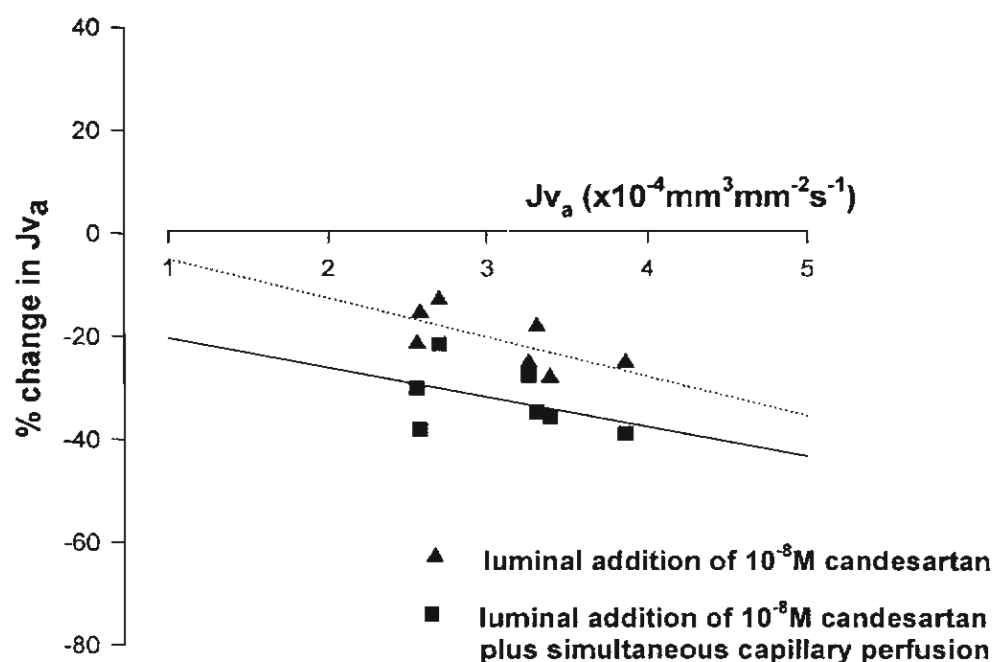
Data are means $\pm$ s.e.m.

*** $P < 0.001$ (paired t-test) compared with control tubular fluid (TF)

$P < 0.05$ (paired t-test) compared with 10^{-8} M candesartan in TF

ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่า Jv_a เมื่อทำ luminal addition of 10^{-8} M candesartan และเมื่อทำ luminal addition of 10^{-8} M candesartan พร้อมกับ peritubular capillary perfusion ด้วย PTF กับค่า initial Jv_a แสดงในรูปที่ 7 ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย regression analysis พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า initial Jv_a และค่า %change in Jv_a ขณะทำการทดลองทั้งสองแบบไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

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



Both lines were obtained from regression analysis

Least square fit for 8 WKY (solid triangle) with luminal addition of 10^{-8} M candesartan:

$$\% \text{ change in } Jv_a = 2.6 - 7.6Jv_a, r^2 = 45\%, \text{ NS}$$

Least square fit for 8 WKY (solid square) with luminal addition of 10^{-8} M candesartan plus simultaneous peritubular capillary perfusion :

$$\% \text{ change in } Jv_a = -14.7 - 5.7Jv_a, r^2 = 20\%, \text{ NS}$$

3. ผลของ simultaneous peritubular capillary perfusion of 10^{-8} M candesartan ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 3)

ผลของ simultaneous peritubular capillary perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ทดลองในหนู 6 ตัว โดยการทำให้แบบสลับลำดับการทดลองเพื่อหลีกเลี่ยงผลของเวลา ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อทดลองโดยการ perfuse peritubular capillary ด้วย 10^{-8} M candesartan พบว่าค่าเฉลี่ยของ J_{v_a} ลดลงประมาณ 33% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่า control TF (TF, 3.26 ± 0.19 และ PTF+ 10^{-8} M candesartan, $2.22 \pm 0.30 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันใน 2 ช่วงการทดลอง

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

	control (TF)	10^{-8} M candesartan in PTF
MABP (mmHg)	117 ± 5	116 ± 5
$J_{v_a} (\times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1})$	3.26 ± 0.19	$2.14 \pm 0.11^{***}$
Number of rat	8	
Body weight (g)	280 ± 12	

Data are means $\pm$ s.e.m.

*** $P < 0.001$ (paired t-test) compared with control tubular fluid (TF)

4. ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan และ ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan with simultaneous peritubular capillary perfusion of 10^{-8} M candesartan ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 4)

ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan และผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan with simultaneous peritubular capillary perfusion of 10^{-8} M candesartan ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ทดลองในหนู 6 ตัว โดยการทำให้แบบสลับลำดับการทดลองเพื่อหลีกเลี่ยงผลของเวลา ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อทดลองโดยการเติม 10^{-8} M candesartan เข้าไปใน luminal tubular fluid พบว่าค่าเฉลี่ยของ J_{v_a} ลดลง 25% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่า control TF (TF, 3.51 ± 0.16 และ TF+ 10^{-8} M candesartan, $2.61 \pm 0.19 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) และในขณะที่ทำ luminal perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan ก็ทำ peritubular capillary perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan ที่ละลายใน protein-free plasma-like peritubular fluid (PTF) รอบ ๆ ท่อ proximal tubule ที่ทำการทดลอง พบว่าค่าเฉลี่ยของ J_{v_a} ลดลงอีก 19% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จาก luminal perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan และค่านี้จะลดลง 43% อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่า control TF (TF, 3.51 ± 0.16 และ 10^{-8} M candesartan + PTF, $1.99 \pm 0.12 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ช่วงการทดลอง

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 (J_{v_a})

	control (TF)	10^{-8} M candesartan in TF	10^{-8} M candesartan in TF + 10^{-8} M candesartan in PTF
MABP (mmHg)	123 ± 10	124 ± 7	127 ± 6
J_{v_a} ($\times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2}$)	3.51 ± 0.16	$2.61 \pm 0.19^{***}$	$1.99 \pm 0.12^{*** \#}$
Number of rat	6		
Body weight (g)	253 ± 10		

Data are means $\pm$ s.e.m.

*** $P < 0.001$ (paired t-test) compared with control tubular fluid (TF)

$P < 0.05$ (paired t-test) compared with control tubular fluid (TF)

บทวิจารณ์

ในการทำให้เทคนิค video-based of computerized method for digital image capture and analysis of shrinking split-drop micropuncture เพื่อใช้วัดค่าอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ของไตหนูเป็นเทคนิคมาตรฐานเดียวกับงานที่เคยตีพิมพ์มาก่อนแล้ว (Harris et al., 1987) อุปกรณ์ต่างๆรวมทั้ง computer software ที่ใช้ในงานนี้จะเป็นแบบเดียวกัน โดยการทดลองในตอนแรกจะเป็นการตรวจสอบค่าอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ในสองช่วงเวลาคือประมาณชั่วโมงที่ 1-2 และ ชั่วโมงที่ 3-4 หลังจากผ่าตัดสัตว์ทดลองเพื่อเตรียมทำ microperfusion ที่ proximal tubule แล้ว จากผลการทดสอบที่ไม่ได้แสดงค่ารายละเอียดในรายงานนี้พบว่า ค่าต่างๆ ได้แก่ mean diameter, reabsorptive half time, ค่าอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ต่อหน่วยพื้นที่และต่อหน่วยความยาวท่อที่เก็บได้จากเวลาทั้งสองโดยใช้ control mid-proximal tubular fluid ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และค่าทั้งหมดดังกล่าวรวมทั้ง mean arterial blood pressure ก็อยู่ในช่วงเดียวกับที่เคยได้ศึกษาและรายงานมาก่อน การที่ค่าต่างๆ เหล่านี้ไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่ใช้ทดลองโดยประมาณ 1-4 ชั่วโมงทำให้การออกแบบการทดลองแบบเปรียบเทียบในหนูตัวเดียวกันทำให้ไม่ต้องนำปัจจัยเวลามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ การทำการทดลองแบบสลับลำดับการทดลองยังทำให้ไม่ต้องคำนึงถึงปัจจัยเวลาด้วย

ผลของการทำ simultaneous peritubular capillary perfusion ที่มีต่อค่าอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 1)

เนื่องจากการดูดกลับของเหลวในส่วน proximal tubule ขึ้นกับการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน angiotensin II (ANGII) ที่พบว่ามีทั้งทางด้าน lumen และ peritubular capillary โดยทางด้าน lumen จะมีความเข้มข้นมากกว่า 1,000 เท่า (Seikary et al., 1990; Braam et al., 1993) นอกจากนี้ Braam et al. (1993) ยังได้เสนอว่า proximal tubular epithelial cell เองสามารถสร้าง ANGII และหลั่งเข้ามาใน lumen ได้ ส่วนบทบาททางสรีรวิทยาของ luminal ANGII ยังไม่ทราบแน่ชัด

การทดลองโดยทำ simultaneous peritubular capillary perfusion ด้วยสารละลาย plasma-like peritubular fluid (PTF) ขณะที่วัดค่าอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (J_{v_a}) จะเป็นการ remove circulating level ANGII ที่จะออกฤทธิ์ทางด้าน peritubular capillary ออกไปได้ดังการทดลองของกลุ่มที่ 1 ของงานวิจัยนี้ ซึ่งพบว่าค่า J_{v_a} มีค่าเฉลี่ยลดลง 27% เมื่อเทียบกับ tubule ที่ไม่มีการทำ capillary perfusion อาจเป็นไปได้ว่าการลดลงของค่า J_{v_a} นั้นไม่ทำให้เกิดจากการขาดการกระตุ้นจากฮอร์โมน ANGII เพียงอย่างเดียวเนื่องจาก humoral substances อื่นๆ อาจหายไปด้วย อย่างไรก็ตามในการทดลองของ Thomas et al. (1988, 1990) ที่ได้ทำ

capillary perfusion ด้วย PTF อย่างเดียวและ PTF+ picomolar ANGII เปรียบเทียบกับค่า control J_{v_a} พบว่า การเติมฮอร์โมน ANGII เข้าไปในสารละลาย PTF สามารถทำให้ค่า J_{v_a} ที่ลดลงกลับเข้าสู่ค่าเฉลี่ย (non-perfused control J_{v_a}) ได้ จากรูปที่ 1 ได้แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของ peptide hormones ที่ทำให้เกิดการกระตุ้น proximal tubular fluid reabsorption จะมีกลไกผ่าน final common pathway ตัวเดียวกันคือ sodium-hydrogen ion exchange (NHE) ที่ผนังเซลล์ด้าน luminal หรือ brush border และเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน ANGII เพียงตัวเดียวหรือการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน ANGII ร่วมกันกับ peptide hormones ตัวอื่นในขณะเดียวกันก็จะทำให้เกิดการกระตุ้น luminal NHE ได้ในระดับเดียวกัน

เป็นที่น่าสังเกตว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า initial J_{v_a} กับเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่า J_{v_a} เมื่อทำ simultaneous peritubular capillary perfusion เป็นแบบ negative คือถ้าค่าเฉลี่ย initial J_{v_a} ในหนูตัวใดมีค่าสูงจะทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงมากขึ้น เนื่องจากการทดลองนี้ไม่ได้วัดระดับ circulating ANGII ทำให้ยังไม่อาจสรุปได้ว่า circulating ANGII ที่อาจจะแตกต่างกันจะเป็นตัวบ่งชี้ค่า initial J_{v_a} ที่แตกต่างกันในหนูแต่ละตัว

ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan และ ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan with simultaneous peritubular capillary perfusion ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 2)

ในการทดลองเพื่อศึกษา locally produced ANGII หรือ ANGII ที่ถูกสร้างโดย proximal tubular cell แล้วหลั่งเข้ามาใน lumen ที่มีผลต่อค่า J_{v_a} นั้นใช้ angiotensin type I receptor (AT_1) antagonist คือ candesartan (Astra Pharmaceutical, Sweden) ซึ่งมีรายงานมากมายถึงความจำเพาะเจาะจงกับ AT_1 ซึ่งเป็น receptor ที่พบมากถึง 90% ภายในไต (Zhuo et al., 1993) โดยเฉพาะที่ proximal tubule มีรายงานว่า angiotensin receptor ภายใน lumen น่าจะมีเพียงชนิด AT_1 เท่านั้น (Hiranyachattada & Harris, 1996) สำหรับความเข้มข้นของ candesartan ที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (Astra Pharmaceutical, Sweden) และจากการทดลองของ Smart et al. (1999) พบว่าที่ 10^{-8} M จะเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้การยับยั้งการดูดกลับ fluid สูงสุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ candesartan ที่ความเข้มข้น 10^{-8} M เติมเข้าไปในสารละลาย TF พบว่าสามารถยับยั้ง fluid reabsorption ได้ประมาณ 19% ซึ่งแสดงว่า luminal ANGII น่าจะมีส่วนช่วยในกระบวนการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ส่วนหนึ่ง

จากการทำ peritubular capillary perfusion ด้วย PTF ในขณะที่เติม 10^{-8} M candesartan ในสารละลาย TF เข้าภายใน lumen ไม่ได้ทำให้ค่าเฉลี่ย J_{v_a} ลดลงจากการที่ทำ peritubular capillary perfusion ด้วย PTF เพียงอย่างเดียว คือเปอร์เซ็นต์ของการลดลงของ J_{v_a} มีค่าเท่ากันประมาณ 28% ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ของ ANGII ไม่ว่าจากทางด้าน lumen

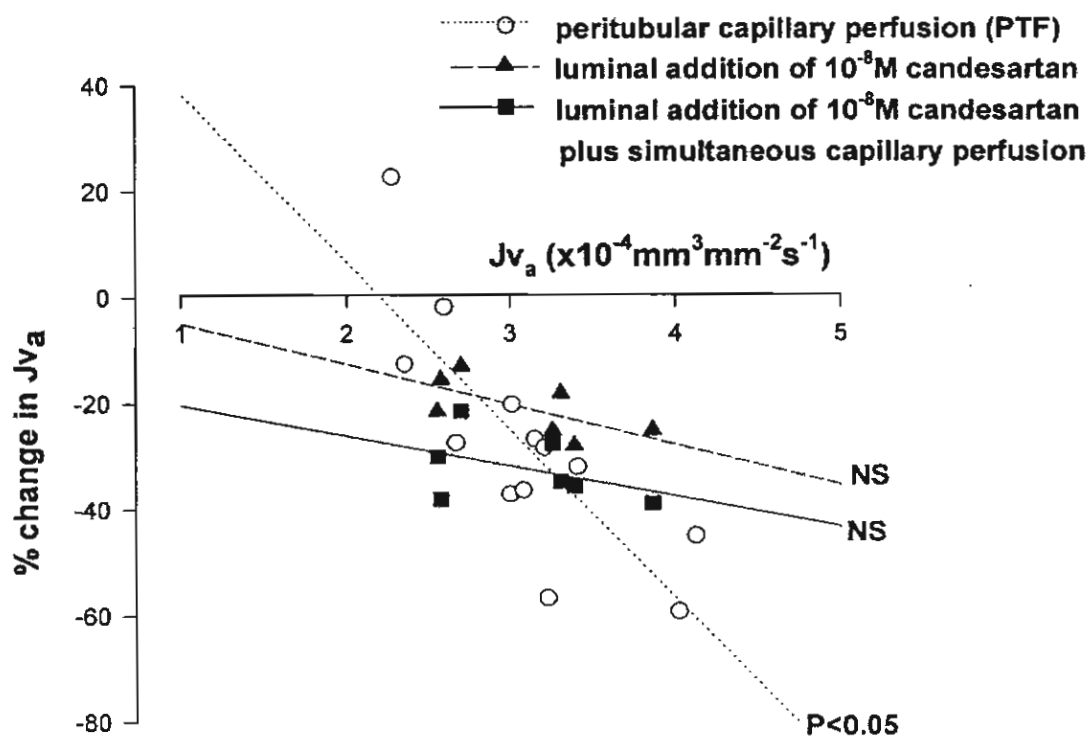
หรือ peritubular capillary ในการกระตุ้นการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule จะมีกลไกผ่าน common pathway ตัวเดียวกัน NHE ที่ brush border และจากการศึกษาโดยใช้ amiloride และ ethyl isopropyl amiloride (EIPA) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ NHE พบว่า NHE ที่ brush border มีส่วนร่วมในการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ประมาณ 1 ใน 3 เท่านั้น นอกจากนี้ brush border NHE จะเป็น final common pathway ในกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนอื่นๆ ที่ proximal tubule อีกด้วย

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า initial J_{v_s} และค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่า J_{v_s} เมื่อให้ candesartan ร่วมกับ TF และกับเมื่อให้ candesartan ร่วมกับ TF พร้อมกับ ทำ peritubular capillary perfusion ด้วย PTF ในหนูแต่ละตัวพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 8 ในขณะเดียวกันพบว่า regression line ของความสัมพันธ์ทั้งสองแบบในหนูที่มีค่า initial J_{v_s} ระหว่าง 2.5 ถึง 4 ($\times 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) น่าจะเป็นเส้นขนาน ซึ่งหมายความว่า ถ้ายับยั้งการออกฤทธิ์ของ ANGII ที่ผ่านทาง brush border AT_1 เพียงอย่างเดียว จะส่งผลต่อการลดอัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule น้อยกว่าเมื่อ remove เอา circulating ANGII ออกด้วยเสมอ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า regression line ของความสัมพันธ์ระหว่างค่า initial J_{v_s} กับค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่า J_{v_s} เมื่อทำ peritubular capillary perfusion ด้วย PTF กลับมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8) จึงอาจสรุปในขณะนี้ได้ว่า ANGII มีบทบาทสำคัญในการควบคุม proximal fluid reabsorption และทั้ง circulating ANGII และ luminal ANGII มีส่วนรับผิดชอบในการควบคุมการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule โดยอาจเป็นเป็นได้ว่า receptor ของ ANGII ทั้งด้าน lumen และด้าน basolateral ต้องถูก activate ในขณะเดียวกันเพื่อควบคุมอัตราการดูดกลับของเหลวใน nephron ส่วนนี้

ผลของ simultaneous peritubular capillary perfusion with 10^{-8}M candesartan ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 3)

การทดลองโดยทำ simultaneous peritubular capillary perfusion ด้วยสารละลาย plasma-like peritubular fluid (PTF) ที่มี 10^{-8}M candesartan พบว่าค่า J_{v_s} มีค่าเฉลี่ยลดลง 33% เมื่อเทียบกับ tubule ที่ไม่มีการทำ capillary perfusion และค่านี้จะไม่แตกต่างจากค่าเมื่อทำ simultaneous peritubular capillary perfusion โดยไม่มี candesartan (กลุ่มที่ 1 ที่มีค่าเฉลี่ย J_{v_s} ลดลง 28%) ซึ่งแสดงว่าการ remove ANGII จาก circulation ไม่ว่าโดยการใช้สารละลาย PTF หรือการใช้ ANGII receptor antagonist จะทำให้อัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule ลดลง แสดงว่า circulating ANGII ในภาวะปกติออกฤทธิ์กระตุ้น proximal reabsorption ผ่านทาง ตัวรับชนิด AT_1

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



ผลของ luminal addition of 10^{-8} M candesartan with simultaneous peritubular capillary perfusion with 10^{-8} M candesartan ที่มีต่ออัตราการดูดกลับของเหลวที่ proximal tubule (กลุ่มที่ 4)

ผลการทดลองเพื่อศึกษา locally produced ANGII หรือ ANGII ที่ถูกสร้างโดย proximal tubular cell แล้วหลั่งเข้ามาใน lumen ที่มีผลต่อค่า J_{V_a} ในการทดลองกลุ่มนี้นั้น พบว่า 10^{-8} M candesartan ลด fluid reabsorption ได้ 22% ซึ่งประมาณเท่ากับในการทดลองกลุ่มที่ 2 แต่เมื่อทำ peritubular capillary perfusion และ luminal perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan พร้อมกันพบว่า ปริมาณ fluid uptake ลดลงเป็น 43% ซึ่งการลดลงนี้จะมากกว่าการลดลงโดยการทำ luminal perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan เพียงอย่างเดียว (กลุ่ม 2) แต่จะไม่ลดลงมากกว่ากลุ่มที่ทำ peritubular capillary perfusion ด้วย 10^{-8} M candesartan เพียงอย่างเดียว (กลุ่ม 3)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของระดับ ANGII ภายใน lumen และจาก peritubular capillary ของ proximal tubule ของไตหนูขาวในภาวะปกติ โดยการใช้ specific ANGII receptor antagonist (candesartan) พบว่า ANGII ทั้งจากภายใน lumen และจาก peritubular capillary จะส่งผลร่วมกันกระตุ้น fluid reabsorption ผ่านทางตัวรับชนิด AT_1 ความเข้มข้นของ ANGII จากด้านใดด้านหนึ่งหรือจากด้านเดียวจะไม่ทำให้การออกฤทธิ์ของ ANGII ต่อ fluid uptake ที่ proximal tubule เพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นในการกระตุ้นการดูดกลับเกลือโซเดียมและน้ำที่ท่อไตฝอยส่วนนี้จึงต้องการระดับความเข้มข้นของ ANGII ภายใน lumen และจาก peritubular capillary อยู่ในปริมาณและสัดส่วนที่จะทำให้เกิด maximal expression ของกลไกการกระตุ้นผ่านทาง AT_1 นี้ได้

เอกสารอ้างอิง

- Ader, J-L., Tran-Van, T. and Praddaude, F. (1987). Reduced urinary kallikrein activity in rats developing spontaneous hypertension. *Am. J. Physiol.* **252(21)**:F964—F969.
- Beierwaltes, W.H., Arendshorst, W.J. and Klemmer, P.J. (1982). Electrolyte and water balance in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. **4**:908—915.
- 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(43)**:F940—F945.
- Dietz, R., Schomig, A., Haebara, H., Mann, J.F.E., Rascher, W., Luth, J.B., Grunherz, N. and Gross, F. (1978). Studies on the pathogenesis of spontaneous hypertension of rats. *Cir. Res.* **43(1)(Suppl 1)**:I98—I106.
- Gibson, R.E., Thorpe, H.H., Cartwright, M.E., Frank, J.D., Schorn, T.W. Bunting, P.B. and Siegl, P.K.S. (1991). Angiotensin II receptor subtypes in renal cortex of rats and rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.* **261**:F512—F518.
- Györy, A.Z. (1971). Reexamination of the split oil droplet method as applied to kidney tubules. *Pflugers Arch.* **324**:328—343.
- Györy, A.Z., Lingard, J.M. and Young, J.A. (1974). Relation between active sodium transport and distance along the proximal convolutions of rat nephrons: evidence for homogeneity of sodium transport. *Pflugers Arch.* **348**:205—210.
- Harrap, S.B. and Doyle, A.E. (1985). Total body sodium in immature spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **12**:315—318.
- 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., Cullinan, M., Thomas, D. and Morgan, T.O. (1987). Digital image capture and analysis for split-drop micropuncture. *Pflugers Arch.* **408**:615—618.
- 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. Exp. Pharmacol. and Physiol.* Suppl 3:S112-S118.

- Herlitz, H., Ricksten, S.E., Lundin, S., Thoern, P., Aurell, M. and Berglund, G. (1983). Renal denervation and sodium balance in young spontaneously hypertensive rats. *Renal Physiol.* **6**:145–150.
- Hiranyachattada, S. and Harris, P.J. (1996). Modulation by locally produced luminal angiotensin II of proximal tubular sodium reabsorption via an AT₁ receptor. *British J. Pharmacol.* **119**:617-618.
- Liu, F-Y. and Cogan, M.G. (1986). Axial heterogeneity of bicarbonate, chloride and water transport in the rat proximal convoluted tubule. Effects of changes in luminal flow rate and of alkalemia. *J. Clin. Invest.* **78**:1547–1557.
- Sato, K. (1975). Reevaluation of micropuncture techniques: some of the factors which affect the rate of fluid absorption by the proximal tubule. In: *Biochemical Aspects of Renal Function: Current Problems in Clinical Biochemistry*, edited by Angielski, S. and Dubach, U.C. Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna. **4**:175–187.
- Schuster, V.L., Kokko, J.P. and Jacobson, H.R. (1984). Angiotensin II directly stimulated sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J. Clin. Invest.* **73**:507–515.
- Seikaly, M.G., Arant, B.S., Jr. and Seney, F.D., Jr. (1990). Endogenous angiotensin concentration in specific intrarenal fluid compartment of the rat. *J. Clin. Invest.* **86**:1352–1357.
- Shibouta, Y., Inada, Y., Ojima, M., Wada, T., Noda, M., Sanada, T., Kubo, K., Kohara, Y., Naka, T. and Nishikawa, K. (1993). Pharmacological profile of a highly potent and long-acting angiotensin II receptor antagonist, 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]-1H-benzimidazol-7-carboxylic acid (CV11974), and its prodrug, (±)-1-(cyclohexyloxycarbonyloxy)-ethyl 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1-H-benzimidazol-7-carboxylate (TCV-116). *J. Pharm. Exp. Ther.* **266**(1):114-120.
- Smart, M.L., Hiranyachattada, S. and Harris, P.J. (1999). Effects of angiotensin II receptor blockade on proximal fluid uptake in the rat kidney. *British J. Pharmacol.* **126**:697-700.

- 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: *Hormonal Control of Epithelial Transport*, Vol 85, Paris, INSERM, pp. 273–278.
- Spitzer, A. and Windhager, E.E. (1972). Continuous *in vivo* perfusion of the postglomerular capillary network in superficial rat kidney cortex. *Yale J. Biol. Med.* **45**:307–311.
- Thomas, D., Harris, P.J. and Morgan, T.O. (1990). Altered responsiveness of proximal tubule fluid reabsorption to peritubular angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **8**:407–410.
- Wang, T. and Chan, Y.L. (1987). Evidence for functional angiotensin receptors on the apical side of the rat proximal convoluted tubule. *Kidney Int.* **31**:291–298.
- Wang, T. and Chan, Y.L. (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.
- Wiederholt, M., Langer, K.H., Thosenes, W. and Hierholzer, K. (1968). Funktionelle und morphologische untersuchungen am proximalen und distalen konvolut der ratteniere zur methode der gespalten olsaule (split droplet method). *Arch. Ges. Physiol.* **302**:166–191.
- Wong, P.C., Barnes, T.B. Chui, A.T. and Timmermans, P.B.M.W.M. (1991). Losartan (DuP753), an orally-active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev.* **9**:317–339.
- Xie, M-H., Liu, F-Y., Wong, P.C., Timmermans, P.B.M.W.M. and Cogan, M.G. (1990). Proximal nephron and renal effects of DuP753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Kidney Int.* **38**:473–479.
- Zhuo, J., Song, K., Abdelrahman, A. and Mendelsohn, F.A.O. (1994). Blockade by intravenous losartan of AT₁ angiotensin II receptors in rat brain, kidney and adrenals demonstrated by *in vitro* autoradiography. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **21**:557–567.

Output จากโครงการ

Published Abstract

1. Siriphun Hiranyachattada and Peter J. Harris. (2002). Regulation of renal proximal fluid uptake by luminal and peritubular angiotensin II. 5th Scientific Congress Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Kuala Lumpur, Malaysia.
PP111.126
(ภาคผนวก 1)

Manuscript (on preparation)

1. Siriphun Hiranyachattada and Peter J. Harris. (2003) Regulation of renal proximal fluid uptake by luminal and peritubular angiotensin II. (submit to Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone (JRAAS).
(หมายเหตุ ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมอีก 2 กลุ่มการทดลอง นอกเหนือจากข้อมูลที่ปรากฏในรายงานฉบับสมบูรณ์และใน proposal ที่เสนอ สกว. เพื่อให้ต้นฉบับมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น)

ภาคผนวก 1

REGULATION OF RENAL PROXIMAL FLUID UPTAKE BY LUMINAL AND PERITUBULAR ANGIOTENSIN II

Siriphun Hiranyachattada¹ and Peter J. Harris²

¹ Department of Physiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110 Thailand, ² Department of

Physiology, The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3052 Australia

Angiotensin II (AngII) when was added to either luminal or peritubular capillary exerts a dose-dependent biphasic action on proximal fluid reabsorption. Low dose (10^{-12} - 10^{-10} M) stimulates fluid transport while higher dose ($>10^{-8}$ M) inhibits (1-2). The concentration of AngII in proximal lumen is reported to be in the nanomolar range, 100-1,000 times higher than in peritubular blood (3-4) and it has been suggested that the proximal tubule secretes AngII into the tubular lumen. The physiological significance of the effects of luminal AngII on proximal tubular fluid transport is unclear but it is likely that it stimulates fluid uptake via angiotensin receptor type I (AT_1)(5). We investigated the regulation of renal proximal fluid transport by luminal (predominantly locally produced) and peritubular capillary (circulatory) AngII using a selective angiotensin receptor type I (AT_1) antagonist (candesartan).

Male Wistar Kyoto rats (BW 185-440g) were anaesthetised with Inactin (110 mg/kg; ip) Saline (0.9% NaCl) was infused (1.6 ml/hr per 100 g BW; iv) and carotid pressure monitored throughout the experiment. The left kidney was exposed and after 1-2 hour equilibration, shrinking-split droplet microperfusion was performed in proximal tubules by injecting Sudan Black stained castor oil from a double barrelled 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 barrelled 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) or similar solution containing 10^{-8} M candesartan. Measurement of proximal fluid reabsorption rate (J_v) was performed using computerized video-based method for digital image capture and analysis of shrinking split-droplet micropuncture (6). Experiments were divided in to 4 groups. In each animal, mean control or initial J_v values were obtained from 2-7 tubules. Average J_v values were then obtained when luminal and peritubular capillaries were perfused with or without AT_1 antagonist.

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

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

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. The magnitude of this decrease was similar in Groups 1-3 but significantly greater in Group 4 compared with Group 2, consistent with an effect of AT_1 receptor blockade in addition to the removal of AngII from these compartments by perfusion. 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.

References:

- Harris, P.J. and Young, J.A. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Physiol. Rev.* 367:295-297, 1977.
- Wang, T. and Chan, Y.L. Mechanism of angiotensin II action on proximal tubular transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252:689-695, 1990.
- Seikaly, M.G., Arant, B.S. and Seney, F.D. Endogenous angiotensin concentration in specific intrarenal fluid compartment of the rats. *J. Clin. Invest.* 86:1352-1357, 1990.
- Braam, B., Mitchell, K.D., Fox, J. and Navar, L.G. Proximal tubular secretion of angiotensin II in the rats. *Am. J. Physiol.* 264: F891-F898, 1993.
- Smart, M., Hiranyachattada, S. and Harris, P.J. Effects of angiotensin II receptor blockade on proximal fluid uptake in the rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 126:697-700, 1990.
- Harris P.J., Cullinan, M., Thomas, D and Morgan, T.O. Digital image capture and analysis for split-drop micropuncture. *Physiol. Rev.* 408, 615-18, 1987.